

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

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



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 71 número 3, 2012





Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz

# **REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

---

Volume 71 número 3, 2012  
Julho - Setembro 2012

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

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

### Editor Chefe

Adriana Bugno

### Editor Adjunto

Luis Fernando de Macedo Brígido

### Editores Assistentes

Christiane Asturiano Ristori Costa

Jacqueline Tanury Macruz Peresi

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Maria Helena Iha

Maria Helena Martini

Miriam Solange Fernandes Caruso

Neuza Kasumi Shirata

Raquel dos Anjos Fazioli

### Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

---

## Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.

Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.

Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.

Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.

Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.

Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.

Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.

Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.

Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.

Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.

Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.

Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.

Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.

John Gilbert, York, UK.

Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restreppo, Medellín, Colômbia.

Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.

Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.

Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.

Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.

Paul W. Flinn, Kansas, EUA.

Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.

Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.

Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.

Thales de Brito, São Paulo, Brasil.

Vanessa Yardley, London, UK.

Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.

Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.

Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

---

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

1941

2012, 71(3)

ISSN 0073-9855

CDD<sub>18</sub> 614.07205

RIALA 6

ISSN 1983-3814 versão *on line*

ISSN 2176-3844 CD-ROM

(\* ) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text.

<http://revista.ial.sp.gov.br>

Portal de Revistas Saúde SP

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1487 Avaliação das atividades antifúngica e antimicotóxina de extratos fenólicos de farelo de arroz**  
Evaluation of antifungal and antimycotoxin activities of phenolic extracts from rice bran  
Michele Moraes de SOUZA, Meritaine da ROCHA, Melissa dos Santos OLIVEIRA, Eliana BADIALE-FURLONG..... 437-441
- 1488 Determinação de fumonisina B<sub>1</sub> por CLAE: estudo da estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído**  
Determination of fumonisin B<sub>1</sub> by HPLC: stability study of the fumonisin B<sub>1</sub>-ortho-phthaldialdehyde derivative  
Mateus Henrique PETRARCA, Elizeu Antonio ROSSI, Célia Maria de SYLOS ..... 442-449
- 1489 Contaminação fúngica no leite humano e em sítios anatômicos de lactantes e lactentes**  
Fungal contamination in human milk and in the anatomic sites of breastfeeding mothers and infants  
Geraldo dos Santos OLIVEIRA, Rosa Helena LUCHESE, Franz Reis NOVAK, Daniel Paiva Barros de ABREU,  
Amanda Mattos Dias MARTINS..... 450-455
- 1490 Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango**  
Use of Bolton broth for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses  
Valeria de Mello MEDEIROS, Silvia Maria Lopes BRICIO, Ana Luzia Lauria FILGUEIRAS,  
Maysa Beatriz Mandetta CLEMENTINO ..... 456-461
- 1491 Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante**  
Evaluation of the alcoholic extract of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a protective antibacterial and antioxidant component  
Mônica Jachetti MACIEL, Marcelo Pinto PAIM, Heloisa Helena Chaves CARVALHO, José Maria WIEST..... 462-470
- 1492 Composição Química e Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda)**  
Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (eucalyptus) and *Lavandula angustifolia* (lavender) breastfeeding mothers and infants  
Sheila Mello da SILVEIRA, Anildo CUNHA Jr., Gerson Neudí SCHEUERMANN, Fábio Luiz SECCHI, Silvani VERRUCK,  
Marisete KROHN, Cleide Rosana Werneck VIEIRA ..... 471-480

- 
- 1493 Acceptance of microfiltered milk by consumers aged from 7 to 70 years**  
 Aceitação de leite microfiltrado por consumidores com idade entre 7 e 70 anos  
 Rita de Cássia dos Santos Navarro da SILVA, Christiane Mileib VASCONCELOS, Jéssica Yoko SUDA,  
 Valéria de Paula Rodrigues MINIM, Ana Clarissa dos Santos PIRES, Antônio Fernandes de CARVALHO..... 481-487
- 1494 Aceitabilidade sensorial de massa de pizza acrescida de farinhas de trigo integral e de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) entre adolescentes**  
 Sensory acceptability of the whole wheat and flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) flours-added pizza dough among adolescent customers  
 Camila Bossoni RUSSO, Caroline Finger SOSTISSO, Isadora Nogueira PASQUAL, Daiana NOVELLO,  
 Herta Stutz DALLA SANTA, Mateus Gatti BATISTA ..... 488-494
- 1495 Concentração de retinol em ovos de codorna e de galinha e sua relação com a recomendação nutricional para vitamina A**  
 Retinol concentration in quail and chicken boiled eggs and its correlation with the daily vitamin A intake recommendation in children  
 Heryka Myrna Maia RAMALHO, Keith Hellen Dias da SILVA, Vanessa Patrícia Queiroz de MEDEIROS,  
 Videanny Videnov Alves dos SANTOS, Juliana Karla Garcia RIBEIRO, Roberto DIMENSTEIN ..... 495-499
- 1496 Influência do uso de cultura adjunta nas características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo Camembert**  
 Effect of the addition of a supplementary culture on the physical-chemical and sensory characteristics of Camembert-type cheese  
 Geruza DIAS, Guilherme Miranda TAVARES, Antônio Fernandes de CARVALHO, Mauro Mansur FURTADO ..... 500-506
- 1497 Avaliação da concentração de flúor nas águas de abastecimento público: estudo retrospectivo e de heterocontrole**  
 Fluoride concentration in the public water supply: the retrospective study and the external control  
 Cecilia Cristina Marques dos SANTOS, Júlio César da Silva RODRIGUES, Maria do Rosário Vigeta LOPES,  
 Rodrigo Friozi POVINELLI, André Luiz Marçal TERRERI..... 507-513
- 1498 Solução alternativa coletiva de abastecimento de água (SAC): avaliação da qualidade bacteriológica e da cloração**  
 Alternative collective resolution for public water supply: Bacteriological and chlorination quality evaluation  
 Inara Siqueira de Carvalho TEIXEIRA, Jacqueline Tanury Macruz PERESI, Sonia Izaura de Lima e SILVA,  
 Aparecida Klai RIBEIRO, Rejane Alexandre Silva GRACIANO, Rodrigo Friozi POVINELLI,  
 Cecília Cristina Marques dos SANTOS..... 514-519
- 1499 Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) salgado seco comercializado em mercados varejistas**  
 Microbiologic and physical-chemical qualities of salted and dried pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) sold in retail markets  
 Emilia do Socorro Conceição de Lima NUNES, Robson Maia FRANCO, Eliane Teixeira MÁRSICO,  
 Monique da Silva NEVES ..... 520-529
- 1500 Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais**  
 Chemical characteristics and functional properties of collagen  
 Tatiane Ferreira da SILVA, Ana Lúcia Barretto PENNA ..... 530-539
- 1501 Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil**  
 Identity and quality of propolis from four regions of Brazil  
 Adriane Alexandre Machado de MELO, Adriana Hitomi MATSUDA, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN..... 540-548
- 1502 Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos**  
 Evaluation of the microbiological contamination in herbal medicines  
 Sarah de Miranda FARIA, Hilda do Nascimento NÓBREGA, Joana Angélica Barbosa FERREIRA, Victor Augustus MARIN.... 549-556

<b>1503</b>	<b>Avaliação dos aspectos do controle da qualidade de produtos cosméticos comercializados no Brasil analisados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde</b>	
	Analysis on the quality control aspects of cosmetic products commercialized in Brazil performed by the National Institute of Quality Control in Health	
	Priscila da Nobrega RITO, Rosaura de Farias PRESGRAVE, Eloisa Nunes ALVES, Gisele HUE, Maria Helena Simões VILLAS BÔAS .....	557-565
<b>1504</b>	<b>Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não fracionadas pelas metodologias de inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO) e de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)</b>	
	Comparative study on the biological activity of non-fractionated heparin by using sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA) and activated partial thromboplastin time (APTT) methodologies	
	Dalvim Pereira dos ANJOS, André Vicente Plastino SILVA, Sergio Alves da SILVA, Wlamir Corrêa de MOURA, Antonio Eugenio Castro Cardoso de ALMEIDA.....	566-572
<b>1505</b>	<b>Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV</b>	
	Assessing the effect of multiple freeze-thaw cycles on the stability of serum samples for anti-HIV antibody detection	
	Márcia Jorge CASTEJON, Rosemeire YAMASHIRO, Camila Cardoso de OLIVEIRA, José Carlos OLIVIERI, Carmem Aparecida de Freitas OLIVEIRA, Mirthes UEDA .....	573-581
<b>1506</b>	<b>Estudo soropidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana</b>	
	Leptospirosis seroepidemiological study in horses used for urban traction	
	Kelly CASELANI, Paulo Roberto de OLIVEIRA, Antonio Sergio FERRAUDO, Anna Monteiro Correia LIMA-RIBEIRO, Raul José Silva GÍRIO .....	582-587
<b>■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION</b>		
<b>1507</b>	<b>Efeito da radiação gama sobre a contaminação da carne resfriada de cordeiro Santa Inês</b>	
	Effects of gama radiation on the bacterial contaminants of the refrigerated Santa Inês lamb meat	
	Fernando Joaquim Xavier ALVES, Teófilo José Pimentel da SILVA, Robson Maia FRANCO .....	588-592
<b>1508</b>	<b>Qualidade microbiológica da água utilizada para consumo humano na região do extremo oeste de Santa Catarina, Brasil</b>	
	Microbiological quality of water used for human consumption in the extreme western region of Santa Catarina, Brazil	
	Diane SCAPIN, Eliandra Mirlei ROSSI, Débora ORO.....	593-596
<b>1509</b>	<b>Primeiro relato do vírus Orf em rebanhos caprinos do semiárido brasileiro</b>	
	First report on the Orf virus infection in goat herds from Brazilian semiarid region	
	Silvia Ines SARDI, Antonio Lemos Maia NETO, Adajane OLIVEIRA, Roberto AGAPITO, Washington SERAFIM, Marcelo SAMPAIO, Charles MULLER, Juliana Alves TORRES, Gubio Soares CAMPOS.....	597-600
<b>■ NOTA CIENTÍFICA/SCIENTIFIC NOTE</b>		
<b>1510</b>	<b>Perfil dos medicamentos manipulados pelas farmácias comunitárias com Autorização Especial</b>	
	Profile of medicines prepared by the community pharmacies with Special Authorization	
	Francisco Eduardo de PONTES, Helena Pereira da Silva ZAMITH.....	601-604
<b>1511</b>	<b>Opsonization and transformation: effects of anticapsular sera on the DNA transfer in <i>Neisseria meningitidis</i></b>	
	Opsonização e transformação: efeitos do soro anticapsular sobre a transferência de DNA em <i>Neisseria meningitidis</i>	
	Gisele Cristiane Gentile CURY, Rafaella Fabiana Carneiro PEREIRA, Luciana Maria de HOLLANDA, Marcelo LANCELLOTTI.....	605-607

---

■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

**Bifenilos policlorados (PCBs) em milho e farinha de milho do estado do Rio Grande do Sul**

Polychlorinated biphenyls (PCBs) in corn and cornflour from Rio Grande do Sul state

Schwanz, TG..... 608

■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES..... 609-614



## Avaliação das atividades antifúngica e antimicotoxina de extratos fenólicos de farelo de arroz

### Evaluation of antifungal and antimycotoxin activities of phenolic extracts from rice bran

RIALA6/1487

Michele Moraes de SOUZA<sup>1\*</sup>, Meritaine da ROCHA<sup>2</sup>, Melissa dos Santos OLIVEIRA<sup>3</sup>, Eliana BADIALE-FURLONG<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Escola de Química e Alimentos (EQA), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Engenheiro Alfredo Huch, 475, Campus Cidade, Rio Grande, RS, CEP: 96201-900. E-mail: michele.moraesdesouza@gmail.com

<sup>2</sup>Bolsita do CNPq, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos com área de concentração em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

<sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha – Campus Santo Augusto, Santo Augusto, RS  
Trabalho financiado pelo CNPq e Capes, parte da tese de doutorado de Michele Moraes de Souza, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – Ano de defesa: 2012

Recebido: 07.11.2011 – Aceito para publicação: 30.08.2012

#### RESUMO

Neste trabalho, foram feitas associações dos níveis de compostos fenólicos obtidos de farelo de arroz com a inibição da multiplicação dos fungos *Fusarium graminearum*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*, e a inibição da produção de aflatoxinas pelo último micro-organismo. Os compostos fenólicos foram extraídos com metanol e quantificados colorimetricamente com o reagente de Folin-Ciocalteu. A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de ágar diluído. Todos os fungos tiveram seu desenvolvimento inibido em até 2,3% inibição/ $\mu\text{g}_{\text{fenol total}}$  na presença do extrato fenólico de farelo de arroz, além da inibição da produção de micotoxinas em 100%. Esses dados sugerem que o arroz possui defesas naturais contra o ataque por essas espécies fúngicas analisadas, e que podem estar associadas à ocorrência de ácidos fenólicos na sua composição.

**Palavras-chave.** conservador natural, fenóis, inibição fúngica.

#### ABSTRACT

This investigation analyzed the association between the amounts of phenolic compounds extracted from rice bran and the inhibition of *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* proliferation, and the inhibition of aflatoxin production by the latter microorganism. Phenolic compounds were extracted with methanol, and they were quantified by means of colorimeter assay using Folin-Ciocalteu reagent. The antifungal activity was assessed by means of diluted agar technique. The development of the all of fungi were inhibited up to 2.3% inhibition/ $\mu\text{g}_{\text{total phenol}}$  in the presence of rice bran phenolic extract, and the production of mycotoxins was inhibited by 100%. These findings suggest that the rice holds a natural defense against those fungal species attack, which might be associated with the occurrence of phenolic acids.

**Keywords.** conservative natural, phenols, fungal inhibition.

## INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança alimentar vem norteando a busca por conservantes naturais na forma nativa ou extraídos de suas fontes e aplicados a outros ou aos seus próprios derivados. Estudos estão voltados para a identificação e purificação de novos compostos com atividade antifúngica que possam atuar sozinhos ou sinergicamente minimizando a deterioração e o uso dos antifúngicos químicos em alimentos<sup>1,2</sup>.

Os compostos fenólicos presentes em tecidos vegetais podem inibir o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas que se localizam especialmente nos tecidos externos que têm papel de proteção da estrutura<sup>3,4</sup>. Com essa propriedade, destacam-se os ácidos fenólicos e seus derivados presentes em vegetais. Dentre os vegetais considerados fontes de compostos fenólicos, encontram-se o arroz e seus derivados de beneficiamento, que são ricos em ácido ferúlico e cumárico<sup>5,6,7</sup>.

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. Sua importância destaca-se, principalmente, em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. O farelo de arroz constitui de 8 a 10% do grão de arroz e é rico em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais. A composição química deste é influenciada por diversos fatores como variedade, tamanho, forma e resistência à quebra do grão, tipo de moinho, presença ou ausência de gérmen, uniformidade de moagem, além do processo de beneficiamento que tenha sofrido o grão<sup>8,9,10</sup>.

No Brasil, o farelo de arroz é utilizado, principalmente, como matéria-prima para a extração de óleo, produção de ração animal e, em menor escala, como produto dietético e na composição de “multimistura”<sup>8,9,11</sup>. Dessa forma, é interessante conhecer o potencial de resíduos de arroz como fonte de conservadores naturais para extração e utilização na preservação natural dos alimentos. Estimar a susceptibilidade do arroz à contaminação fúngica possibilita a tomada de medidas adequadas para armazenamento e beneficiamento.

Agentes antifúngicos presentes em vegetais são uma alternativa para substituir os aditivos químicos atualmente empregados em alimentos, especialmente no caso do arroz, cujo beneficiamento gera coprodutos com propriedades menos atrativas, que poderiam ser empregadas como fonte desses compostos<sup>1</sup>.

Os fungos como *Aspergillus* e *Fusarium* são considerados importantes produtores de micotoxinas<sup>12</sup>, que são metabólitos tóxicos naturais frequentemente encontradas em alimentos. Entre os tóxicos contaminantes de alimentos, podemos destacar as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se, assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia<sup>13</sup>. Intoxicações e problemas passageiros ou crônicos, que afetam várias funções do organismo, tais como alterações hepáticas, renais, circulatórias, no sistema nervoso e no trato digestivo podem ocorrer em homens e animais devido à ingestão dessas substâncias.

Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou relacionar os níveis de compostos fenólicos obtidos de farelo de arroz com a inibição da multiplicação dos fungos *Fusarium graminearum*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*, e a inibição da produção de aflatoxinas pelo último.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Farelo de arroz

O arroz do cultivar BR-IRGA 417 foi cultivado em campos experimentais do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), localizado em Cachoeirinha (RS), semeada no sistema de cultivo mínimo, com densidade de semeadura de 100 kg.ha<sup>-1</sup>. A adubação de base foi com 400 kg.ha<sup>-1</sup> (N:P:K = 05:20:30), nitrogenada em cobertura com 80 kg.ha<sup>-1</sup> de N, no arroz com 8 folhas antes do início da diferenciação do primórdio da panícula (DPP). Após a colheita, as amostras foram secas até 13% de umidade e beneficiadas na forma de arroz natural polido (branco). No beneficiamento, foram separadas as frações casca, farelo e endosperma amiláceo, sendo que a fração farelo de arroz foi encaminhada ao Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LMCA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para realização dos experimentos.

### Caracterização físico-química

O pH, a acidez, os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibra bruta do farelo de arroz foram determinados segundo AOAC<sup>14</sup>. Os carboidratos solúveis foram determinados por hidrólise ácida e quantificados com o reagente do 3,5-DNS<sup>15</sup>.

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio com metanol, sob agitação em agitador horizontal à temperatura ambiente, seguida de partição com hexano,

clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5%, centrifugação e filtração. Os extratos foram secados em rotaevaporador, diluídos com água e armazenados em freezer a 6 °C, até quantificação e/ou posterior uso. O conteúdo de fenóis totais foi determinado por meio do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, tendo como padrão o ácido ferúlico<sup>16,17</sup>.

### Avaliação da atividade antifúngica

Os fungos utilizados neste estudo foram o *Fusarium graminearum* cedido pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e cultivado em Agar batata dextrose (BDA) a 22 °C durante 10 dias, até sua completa esporulação. *Aspergillus oryzae* foi cedido pelo Laboratório de Micotoxicologia (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (RS) e *Aspergillus flavus* CCT 1217 adquirido da coleção de culturas da Fundação André Tosello. Os micro-organismos do gênero *Aspergillus* foram primeiramente cultivados em Agar batata dextrose a 24 °C durante 12 dias, até sua completa esporulação, e posteriormente mantidos a 4 °C, até o uso. Para o teste da atividade antifúngica, foi empregada uma solução de esporos de  $4 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> obtidos dos esporos dos meios de cultura com solução 0,2% de Tween 80, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer.

O método utilizado foi o bioanalítico *in vitro*, observando o desenvolvimento ou inibição dos micro-organismos em presença de três níveis de concentrações de compostos fenólicos totais no extrato em avaliação. O extrato fenólico de farelo de arroz (15, 20 e 25 mL) foi adicionado ao meio de cultura previamente autoclavado a 120 °C durante 15 minutos. Os meios acrescidos dos extratos foram vertidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro), sob condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, Tipo B<sub>2</sub>). Após a solidificação dos meios, foram adicionados ao centro das placas a solução de esporos, contendo  $4 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> de cada espécie nos seus respectivos experimentos. As placas foram incubadas a 22 °C para *Fusarium graminearum* e 24 °C para *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*.

Foram efetuadas medições ortogonais dos diâmetros das colônias nos 3º, 5º, 7º e 14º dias de incubação, tendo como referência o desenvolvimento de cada espécie cultivada sem adição dos extratos e com adição do grupo controle, composto por água estéril, hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5%<sup>18</sup>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foi calculada e expressa a porcentagem de inibição do crescimento fúngico por µg de composto fenólico no extrato.

No experimento referente à ação antimicotóxicas dos extratos sobre o *Aspergillus flavus*, foi realizada a determinação de aflatoxinas no meio de crescimento das culturas ao 7º, 14º e 21º dias de incubação.

### Efeito *in vitro* de extratos vegetais sobre a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*

As aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram extraídas dos meios de cultura com solução de acetonitrila-água (3:1), sob agitação, seguida de partição com hexano. A acetonitrila foi separada da água com adição de cloreto de sódio e evaporada a 50 °C, sob vácuo. O resíduo foi ressuspensionado com 3 mL de metanol e 27 mL de clorofórmio, centrifugado e separado em três alíquotas de 10 mL, que foram evaporadas em banho-maria a 40 °C e corrente de nitrogênio e armazenadas a -10 °C<sup>19,20</sup>. Os extratos evaporados foram aplicados em cromatofolhas de sílica gel G60 de 0,25 mm de espessura para triagem, confirmação e posterior estimativa da concentração das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> sob luz UV, comparativamente a solução padrão das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub><sup>5,20,21</sup>.

As micotoxinas mais importantes produzidas por *Aspergillus flavus* são as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, produzidas por cerca de 40% dos isolados<sup>22</sup>. Assim demonstrada a inibição da cultura, foi avaliado o efeito do extrato fenólico na produção das aflatoxinas mencionadas por meio do método de cromatografia de camada delgada (CCD). Esse método<sup>20,21</sup> foi adaptado no Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande para avaliar a produção de micotoxinas em um meio de cultura e para uma triagem de efeito dos compostos fenólicos sobre a produção de aflatoxinas, e vem se mostrando um método eficiente por apresentar limites de detecção comparáveis a outros métodos mais sofisticados, aplicabilidade e várias matrizes, baixo custo, rapidez e boa performance. O procedimento possuía como características que o tornaram confiável para o estudo, o limite de detecção de 2,0 ppb, recuperação de 96,5% para aflatoxinas B<sub>1</sub> e 91,5% B<sub>2</sub> e coeficiente de variação de 8%.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias das determinações das características físico-químicas do farelo de arroz, ou seja, umidade, cinzas, carboidratos, fibra bruta, proteínas,

**Tabela 1.** Inibição fúngica do *A. flavus*, *A. oryzae* e *F. graminearum* pelo extrato fenólico de farelo arroz (EFFA)

Dias	% inibição / µg fenol total		
	<i>Aspergillus. oryzae</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
3	0,72 ± 0,03 <sup>a*</sup>	2,3 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,1 <sup>a</sup>
5	0,73 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,15 <sup>a</sup>
7	0,7 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,12 <sup>b</sup>	Nr <sup>**</sup>
14	0,71 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,06 <sup>b</sup>	Nr

\*Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ao nível de confiança de 95%.

\*\*Nr = medição do halo não realizada

**Tabela 2.** Inibição da produção de aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> pelo *Aspergillus flavus* na presença do extrato fenólico de farelo de arroz

Extrato	Fenóis(mg)	Inibição da produção de aflatoxinas (%)					
		7° dia		14° dia		21° dia	
		AFLAB <sub>1</sub>	AFLAB <sub>2</sub>	AFLAB <sub>1</sub>	AFLAB <sub>2</sub>	AFLAB <sub>1</sub>	AFLAB <sub>2</sub>
F.arroz	0,8	32 ± 1,4 <sup>a*</sup>	82 ± 0,6 <sup>a</sup>	70 ± 0,9 <sup>a</sup>	92 ± 1,2 <sup>a</sup>	49 ± 1,1 <sup>a</sup>	88 ± 0,8 <sup>a</sup>
F.arroz	1,2	33 ± 2,1 <sup>a</sup>	91 ± 1,2 <sup>b</sup>	75 ± 1,5 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>b</sup>	54 ± 2,4 <sup>a</sup>	91 ± 1,0 <sup>a</sup>
F.arroz	1,5	58 ± 1,1 <sup>b</sup>	91 ± 0,9 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>b</sup>	89 ± 2,1 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>b</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ao nível de confiança de 95%.

lipídios, pH e acidez, foram respectivamente: 9,6 ± 0,4%, 10,5 ± 0,8%, 44,3 ± 3,1%, 6,3 ± 1,1%, 15,4 ± 0,6%, 12,7 ± 0,4%, 6,1 ± 0,3%, 0,1 ± 0,03%. A composição centesimal determinada para o farelo de arroz foi semelhante à apresentada por outros autores, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de solo, do cultivar, do beneficiamento e da forma de estabilização do farelo<sup>8,10,23</sup>.

Comparativamente a outros tecidos mencionados em literatura como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana 0,31 mg/g de amostra, batata 0,39 mg/g de amostra (equivalente de tirosina), 0,061-0,084 mg/g de amostra (ácido ferúlico)<sup>7</sup>, 0,5 mg/g de amostra em bagaço de laranja e 0,35 mg/g de amostra em polpa de berinjela<sup>17</sup>, o farelo de arroz mostrou-se promissor como potencial de aporte de compostos fenólicos na dieta, pois apresentou um teor médio de 0,75 mg CF/g de farelo de arroz, o que é superior a tecidos usualmente estudados como fontes desses compostos<sup>4,5,7,17</sup> e com atividade antifúngica para as três espécies avaliadas (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta os resultados da inibição específica (% inibição/µg de CFT) para cada espécie fúngica no intervalo de tempo estudado.

Segundo a literatura, os grupos hidroxílicos presentes nos compostos fenólicos podem formar ligações de hidrogênio com enzimas do metabolismo microbiano, desativando-as e inibindo a multiplicação da biomassa fúngica<sup>23,24</sup>, fato que foi demonstrado pela medida do halo de crescimento da colônia cultivada em presença dos extratos fenólicos de farelo de arroz.

Os resultados referentes à adição dos extratos fenólicos de farelo de arroz ao meio de cultura se

apresentaram mais eficazes para a inibição do *Aspergillus flavus*.

Na Tabela 2, estão os resultados dos experimentos referentes à inibição da produção das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> por *Aspergillus flavus* em meio BDA em presença de extratos fenólicos de vegetais, no 7°, 14° e 21° dias de incubação. Os percentuais de inibição foram calculados considerando a não detecção das toxinas nos limites de quantificação do método com 100% de inibição.

Os resultados demonstraram que os extratos fenólicos foram mais eficientes para inibir a produção de AFA B<sub>2</sub>. A inibição da síntese das micotoxinas pelos extratos fenólicos pode ser atribuída à diminuição do estresse oxidativo, que é um pré-requisito para a produção de aflatoxinas, além do aumento da peroxidação lipídica e a geração de radicais livres<sup>25</sup>. Resultado similar de inibição de produção de toxina foi obtido por Selvi et al.<sup>26</sup>, que inocularam o *Aspergillus flavus* em presença do extrato da *Garcinia indica*, planta rica em flavonoides e ácidos fenólicos, e obtiveram uma inibição de 40 a 60% na produção de aflatoxina B<sub>1</sub> e inibição de 10 a 20% do crescimento fúngico.

Os resultados de inibição de crescimento fúngico e da produção de micotoxinas foram consistentes entre si e indicaram que o farelo de arroz possui defesas importantes contra o ataque de *Aspergillus flavus* e das demais espécies, o que é interessante do ponto de vista de segurança alimentar. Do ponto de vista tecnológico, torna-se vantajoso buscar formas de extrair compostos fenólicos das frações externas do grão de arroz, visando empregá-los como antifúngicos naturais.

## CONCLUSÃO

O extrato fenólico de farelo de arroz apresentou atividade antifúngica sobre os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*, inibindo em até 100% a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

## REFERÊNCIAS

1. Brul S, Klis FM. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genet Biol*. 1999;27:199-208.
2. Melo EA, Guerra NB. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol Soc Bras Ciênc Tecnol Alim*. 2002;36:1-11.
3. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chem*. 2010;119:114-22.
4. Souza MM, Oliveira MS, Rocha M, Furlong EB. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa*. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):680-5.
5. Oliveira MS, Badiale-Furlong E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin J*. 2008;1(2):1-10.
6. Tian S, Nakamura K, Cui T, Kayahara H. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *J Chromatogr A*. 2005;1063:121-8.
7. Zhou Z, Robards K, Helliwell S, Blanchard C. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chem*. 2004;87(3):401-6.
8. Walter M, Marchezan E, Avila LA. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciênc Rural*. 2008;38(4):1184-92.
9. Lemos MRJ, Souza-Soares LA. Arroz e seus produtos e subprodutos na região sul do Brasil. *Rev Vetor*. 2000;10:21-36.
10. Silva MA, Sanches C, Amante ER. Farelo de arroz – Composição e propriedades. *Rev Óleos & Grãos*. 2001;34-42.
11. Lemos MRJ, Souza-Soares LA. Farelo de arroz: um subproduto em estudo. *Rev Óleos & Grãos*. 1999;40-7.
12. Nunes IL, Badiale-Furlong E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(2):190-4.
13. Granada G, Rosa V, Zambiasi R, Koetz P. Caracterização de granolas comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):87-91.
14. Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Official Methods of analysis international, 17<sup>o</sup>, CD-ROM, Willian Horwitz, 2000.
15. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar. *Anal Chem*. 1959;3(31):326-428.
16. Souza MM, Recart VM, Rocha M, Cipolatti EP, Badiale-Furlong E. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):192-200.
17. Badiale-Furlong E, Colla E, Bortolato DS, Baisch AM, Souza-Soares LA. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Rev Vetor*. 2003;13:105-14.
18. Nguéack J, Leth V, Amvam Zollo PH, Mathur SB. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):329-34.
19. Garda J, Macedo RM, Badiale-Furlong E. Determinação de tricotecnos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24:657-63.
20. Soares LMV, Rodriguez-Amaya DB. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin-layer chromatographic method. *J Assoc Offic Anal Chem*. 1989;1(72):22-6.
21. Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gás chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;882:23-8.
22. Tanawaki MH, Silva N. Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção. *Núcleo de Microbiologia/ITAL*; p. 2001.
23. Naves MMV. Características químicas e nutricionais do arroz. *Bol CPPA*. 2007;25(1):51-60.
24. Juglal S, Govinden R, Odhav B. Spice oils for the control of co-occurring micotoxin-producing fungi. *J Food Prot*. 2002;65(4):683-7.
25. Jayashree T, Subramayam C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Rad Biol Med*. 2000;29:981-5.
26. Selvi AT, Joseph GS, Jayaprakasha GK. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiol*. 2003;2:455-60.

## Determinação de fumonisina B<sub>1</sub> por CLAE: estudo da estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*ortho*-ftaldialdeído

### Determination of fumonisin B<sub>1</sub> by HPLC: stability study of the fumonisin B<sub>1</sub>-*ortho*-phthaldialdehyde derivative

RIALA6/1488

Mateus Henrique PETRARCA\*, Elizeu Antonio ROSSI, Célia Maria de SYLOS

\*Endereço para correspondência: Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", CP 502, Rodovia Araraquara – Jauú Km 1, Araraquara, SP, Brasil, CEP: 14801-902. E-mail: mateuspetrarca@ig.com.br

Recebido: 14.03.2012 – Aceito para publicação: 16.08.2012

#### RESUMO

Este estudo avaliou a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*ortho*-ftaldialdeído sob diferentes condições de pH, tempo e temperatura, durante a reação de derivatização e as análises cromatográficas. Na derivatização, a máxima fluorescência emitida pelo derivado foi obtida empregando-se a solução de tetraborato de sódio 0,1 M em pH 9,0, e esta não diferiu significativamente das emitidas em pH 8,0, 8,5, 9,5 e 10,0. Em 2 minutos de reação, obteve-se a máxima fluorescência, e esta não diferiu significativamente das emitidas em 4, 6 e 8 minutos de reação. A variação de 0,5 unidade no pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, empregada como fase móvel, influenciou significativamente na separação cromatográfica e na detecção do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*ortho*-ftaldialdeído; em pH entre 3,3 e 3,8, obtiveram-se as maiores intensidades de fluorescência. O aumento na temperatura da coluna cromatográfica resultou na redução de intensidade da fluorescência. O derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*ortho*-ftaldialdeído manteve-se estável entre 20 e 27 °C. A 30 °C, houve redução significativa em 26,5% na intensidade da fluorescência emitida pelo derivado.

**Palavras-chave.** fumonisina B<sub>1</sub>, *ortho*-ftaldialdeído, estabilidade, CLAE, derivatização pré-coluna.

#### ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the stability of fumonisin B<sub>1</sub>-*ortho*-phthaldialdehyde derivative under different conditions of pH, time and temperature, during the derivatization reaction and chromatographic analysis. In the derivatization, the maximum fluorescence emitted by the derivative product was obtained employing a 0.1 M sodium tetraborate solution at pH 9.0, and this did not differ significantly from those emitted at pH 8.0, 8.5, 9.5 and 10.0. Within 2 minutes of reaction, the maximum fluorescence was observed and no significant difference was found when compared with those emitted at 4, 6 and 8 minutes of reaction. The 0.5 unit variation in the pH of 0.1 M sodium phosphate buffer solution, which was used as mobile phase, caused a significant effect on the chromatographic separation and on the fumonisin B<sub>1</sub>-*ortho*-phthaldialdehyde derivative detection. The highest fluorescence intensities were found at pH from 3.3 to 3.8. Reduction in the fluorescence intensity was caused by increasing the chromatographic column temperature. The fumonisin B<sub>1</sub>-*ortho*-phthaldialdehyde derivative remained stable from 20 °C to 27 °C. At 30 °C, it was found a significant reduction in 26.5% in the fluorescence intensity emitted by the derivative product.

**Keywords.** fumonisin B<sub>1</sub>, *ortho*-phthaldialdehyde, stability, HPLC, precolumn derivatization.

## INTRODUÇÃO

As fumonisinas são metabólitos secundários produzidos, principalmente, por fungos filamentosos das espécies *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, isoladas pela primeira vez de cultivos de *Fusarium moniliforme* Sheldon MCR 826 obtidos de milho, e sua estrutura química foi reportada em 1988 por Bezuidenhout e colaboradores<sup>1,2</sup>.

O primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisina B<sub>1</sub> em alimento foi em 1990 por Sydenham e colaboradores, em milho de uma região da África do Sul com alta incidência de câncer esofágico, e os níveis detectados variaram de 44 a 83 µg.g<sup>-1</sup><sup>3</sup>. Desde então, em diferentes regiões do mundo, tem-se reportado a ocorrência de fumonisina B<sub>1</sub> em alimentos e bebidas, como arroz<sup>4</sup>, aspargo e alho<sup>5</sup>, cevada<sup>6</sup>, cervejas<sup>7</sup>, figos secos<sup>8</sup>, leite<sup>9</sup> e, principalmente, em milho e seus derivados<sup>10,11</sup>.

A International Agency for Research on Cancer (IARC) classificou a fumonisina B<sub>1</sub> como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica aos seres humanos<sup>12</sup>. O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que a fumonisina B<sub>1</sub> intervém na biossíntese dos esfingolipídios, em função de sua similaridade estrutural com a esfingosina e a esfinganina<sup>13</sup>.

A incidência de câncer esofágico na África do Sul<sup>14</sup>, China<sup>15</sup>, Itália<sup>16</sup> e Irã<sup>17</sup>, e anormalidades no tubo neural na fronteira México-Texas<sup>18</sup>, estariam associadas à ocorrência de fumonisina B<sub>1</sub> em altos níveis na dieta dessas populações.

Assim, muitos estudos têm reportado o interesse em avaliar os níveis em que essas micotoxinas ocorrem nos alimentos. Para isso, diferentes técnicas analíticas, como cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e eletroforese capilar, e métodos imunológicos como ELISA, têm sido empregados na detecção e quantificação das fumonisinas nos alimentos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência a técnica mais utilizada, em função de sua alta sensibilidade e baixo limite de detecção<sup>19,20</sup>.

A presença de grupos carboxílicos e hidroxilas na estrutura da fumonisina B<sub>1</sub> a caracteriza como molécula polar, solúvel em água e solventes orgânicos como metanol e acetonitrila<sup>20</sup>. No entanto, as fumonisinas B<sub>1</sub> não apresentam nenhum grupo cromóforo em sua

molécula, portanto, não absorvem radiação ultravioleta e visível, e não apresentam fluorescência. Assim, torna-se imprescindível a reação de derivatização para sua determinação por CLAE com detecção de fluorescência<sup>19,20</sup>.

Diferentes reagentes derivatizantes têm sido empregados na determinação de fumonisina B<sub>1</sub>, como 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F)<sup>21</sup>, 9-fluorenilmetil clorofornato (FMOC)<sup>22</sup>, naftaleno-2-3-dicarboxialdeído (NDA)<sup>23</sup> e 6-amino-quinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ.Fluor)<sup>24</sup>. No entanto, o orto-ftaldialdeído (OPA) é o principal reagente utilizado na reação de derivatização pré-coluna da fumonisina B<sub>1</sub><sup>19,20,25</sup>.

Uma vez que fumonisina B<sub>1</sub> apresenta caráter polar, permite-se sua separação por cromatografia em fase reversa. Os principais solventes utilizados como fase móvel são acetonitrila, água, metanol, solução de ácido acético, tampão acetato e tampão fosfato, em diferentes combinações e proporções, em eluição isocrática ou gradiente<sup>19</sup>.

As fases estacionárias geralmente empregadas para a separação de fumonisina B<sub>1</sub> por CLAE são C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>, e as colunas variam entre 100 e 300 mm de comprimento, de 3,2 a 4,6 mm de diâmetro interno, e partículas de 2,5 a 10 µm de tamanho. De acordo com cada autor, observa-se variação também no volume de injeção no sistema cromatográfico, de 10 a 50 µL, e no fluxo da fase móvel, de 0,5 a 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, sendo os mais empregados de 10 µL e 1 mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente<sup>19,25</sup>.

Considerando a relevância dos estudos sobre a ocorrência de fumonisina B<sub>1</sub> em alimentos, é fundamental que as condições da reação de derivatização e das análises cromatográficas sejam controladas, a fim de obterem-se resultados analíticos precisos e exatos da contaminação do alimento por fumonisina B<sub>1</sub>. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído sob diferentes condições de pH, tempo e temperatura, durante a reação de derivatização e as análises cromatográficas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrão e reagentes

O padrão de fumonisina B<sub>1</sub> (98% de pureza) e o reagente de derivatização orto-ftaldialdeído (OPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila e metanol, grau CLAE, foram adquiridos

da J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, EUA). Ácido fosfórico e tetraborato de sódio foram adquiridos da LabSynth (Diadema, SP, Brasil); fosfato monossódico 1-hidrato, da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); 2-mercaptoetanol da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); e ácido bórico da Qhemis (Indaiatuba, SP, Brasil). A água utilizada nas análises foi obtida por meio de sistema de ultra-purificação MilliQ system (Millipore, Milford, MA, EUA).

### Solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub>

O padrão de fumonisina B<sub>1</sub> (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila:água (1:1, v/v) obtendo uma solução estoque de 1.000 µg.mL<sup>-1</sup>, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC)<sup>26</sup>. A partir dessa solução, preparou-se a solução trabalho de 20 µg.mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, e estocadas à -18 °C.

### Derivatização

A reação de derivatização pré-coluna foi de acordo com a AOAC<sup>26</sup>. O reagente de derivatização foi preparado empregando-se 40 mg de OPA, este dissolvido em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M e então adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente foi estocado em frasco âmbar, protegido da luz e em temperatura ambiente, por no máximo uma semana.

Alíquota de 225 µL do reagente de derivatização foi adicionada a um *vial* de 1,5 mL contendo 25 µL de solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub>, e então mantidos em banho de ultrassom por 30 segundos em temperatura ambiente e protegidos da luz, previamente à injeção no cromatógrafo a líquido.

### Análise cromatográfica

Na separação, detecção e quantificação de fumonisina B<sub>1</sub>, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Quioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de fluorescência RF 10A XL em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), injetor automático SIL 10A e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 × 4,6 mm d.i.; partículas de 5 µm) (Thermo, Reino Unido). A fase móvel empregada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M na proporção 44:56, respectivamente, em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>; e volume da injeção de 10 µL.

### Influência do pH, tempo e temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído

#### Reação de derivatização

- pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

Avaliou-se a influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M empregada no preparo do reagente de derivatização sobre a estabilidade do derivado. Prepararam-se diferentes soluções de tetraborato de sódio 0,1 M, cujo pH foi ajustado com ácido bórico 5 M entre 4,0 e 12,0. Dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub>, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> de fumonisina B<sub>1</sub>, temperatura da coluna cromatográfica de 20 °C e fase móvel acetonitrila:tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3.

- Tempo da reação de derivatização

O tempo da reação de derivatização, entre o instante que foi adicionado o reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub> até o momento da injeção no cromatógrafo, foi avaliado entre 2 e 15 minutos. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> de fumonisina B<sub>1</sub> e solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante. A temperatura da coluna cromatográfica manteve-se em 20 °C, e a fase móvel utilizada foi acetonitrila:tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3.

#### Análise cromatográfica

- pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M

Na avaliação do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M empregada como um dos componentes da fase móvel, prepararam-se diferentes soluções tampão fosfato de sódio 0,1 M, cujo pH foi ajustado com ácido fosfórico entre 2,3 e 4,8. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> de fumonisina B<sub>1</sub>. No preparo do reagente derivatizante, utilizou-se solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 e, dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub>, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. A temperatura da coluna cromatográfica manteve-se em 20 °C.

- Temperatura da coluna cromatográfica

A influência da temperatura da coluna sobre a estabilidade do derivado foi avaliada. Para isso,



foram empregadas solução padrão de 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> de fumonisina B<sub>1</sub> e solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante. Dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub>, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. A fase móvel utilizada foi acetoneitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3, e variou-se a temperatura da coluna cromatográfica entre 20 e 30 °C.

### Análise dos dados

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (%), atribuindo o valor máximo à maior área do pico cromatográfico obtida. A variação na intensidade foi empregada como indicador da estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído<sup>27</sup>. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%, empregando o *software* Origin 7.0 (2000).

### Descontaminação do material

Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por, pelo menos, 12 h antes de ser descartado, seguido de acetona e lavagem com água<sup>28</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Reação de derivatização

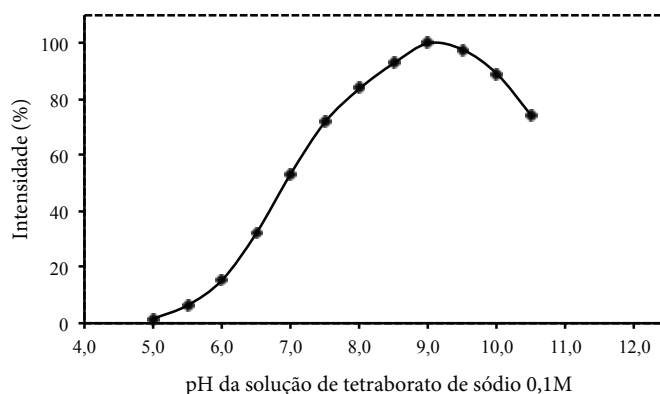
#### *Influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M*

No presente estudo, optou-se pelo emprego do derivatizante OPA por tratar-se de uma reação rápida, fácil e reprodutível em temperatura ambiente, e ser aceito pela AOAC e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). A reação ocorre entre orto-ftaldialdeído e o grupo amina primária da fumonisina B<sub>1</sub>, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol, em meio alcalino, resultando na formação de derivado fluorescente<sup>19,25,29-31</sup>.

No preparo do reagente derivatizante OPA, emprega-se uma solução de tetraborato de sódio. Entretanto, existem divergências quanto ao pH dessa solução, como 8,3<sup>32</sup> e 10,4<sup>33</sup>, enquanto na AOAC<sup>26</sup> não é reportado o ajuste do pH da solução tetraborato de sódio. Contudo, Rice et al.<sup>34</sup>, ao variarem o pH da solução de

tetraborato de sódio 0,1 M de 6,0 a 9,0, reportaram as maiores áreas dos picos cromatográficos em valores de pH entre 8,0 e 8,5, e redução significativa nas áreas em pH acima de 8,5. Assim, o presente estudo avaliou a influência do pH da solução de tetraborato de sódio sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído.

A Figura 1 apresenta as diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M avaliadas e a intensidade da fluorescência. Nos extremos da faixa de pH, 4,0 e entre 11,0 e 12,0, não foi possível a detecção do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído, enquanto próximo à neutralidade, entre 5,0 e 7,0, obteve-se intensidade significativamente menor em relação ao pH 9,0.



**Figura 1.** Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído em diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

Com o emprego da solução de tetraborato de sódio 0,1 M em pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante, obteve-se a intensidade máxima da fluorescência e baixo coeficiente de variação, 3%, não diferindo significativamente da fluorescência emitida em pH 8,0 (83,8%), 8,5 (92,9%), 9,5 (97,7%) e 10,0 (89%), indicando que o derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído é estável na faixa de pH entre 8,0 e 10,0, com pH ótimo de 9,0 para a realização da reação de derivatização.

#### *Influência do tempo da reação de derivatização*

A reação de derivatização com OPA, em temperatura ambiente, resulta na formação de derivados fluorescentes, cuja intensidade da fluorescência pode decrescer minutos após a reação. Recomenda-se que o tempo de reação, entre o instante que é adicionado o reagente derivatizante à amostra até o momento da injeção no cromatógrafo, seja de 1 a 2 minutos<sup>26</sup>.

Em estudo sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído em diferentes tempos de reação, de 0,5 a 64 minutos, e com exposição à luz, Sydenham et al.<sup>35</sup> não observaram diferenças significativas na fluorescência até 4 minutos. No entanto, em 8 e 64 minutos de reação houve redução em 5 e 48% na fluorescência, respectivamente, em comparação à reação em 0,5 minuto, recomendando-se que as injeções no cromatógrafo devam ser realizadas dentro de 4 minutos após a adição do reagente OPA.

Thakur e Smith<sup>36</sup> reportaram que a reação de derivatização em 1 minuto foi a que resultou em intensidade máxima de fluorescência, menor variação e resultados reprodutíveis, e que o declínio na fluorescência com o aumento do tempo de reação não foi linear, no intervalo entre 0,5 e 10 minutos. Pagliuca et al.<sup>31</sup> também estabeleceram o tempo máximo de 1 minuto para a reação de derivatização, pois verificaram redução em aproximadamente 15%, 20%, 20% e 40% na intensidade da fluorescência em 2, 4, 6 e 10 minutos de reação, respectivamente.

Frente aos dados apresentados, o presente estudo avaliou a influência do tempo da reação de derivatização sobre a estabilidade do derivado variando-se o tempo em 2, 4, 6, 8, 10 e 15 minutos, entre o instante que foi adicionado o reagente derivatizante à solução padrão de fumonisina B<sub>1</sub> até o momento de injeção no cromatógrafo.

Ao variar o tempo da reação, de 2 a 15 minutos, verificou-se uma redução significativa na fluorescência do derivado (Figura 2). Com a reação de derivatização em 2 minutos, obteve-se a máxima fluorescência, porém esta não diferiu significativamente da fluorescência emitida em 4 (98,8%), 6 (88,8%) e 8 (83,4%) minutos de reação, indicando que, em temperatura ambiente e sob proteção da luz, os derivados fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído são estáveis por até 8 minutos.

No entanto, em 10 e 15 minutos de reação, verificou-se redução em 23,3 e 37,7% na intensidade da fluorescência, respectivamente, em relação à reação em 2 minutos. Notou-se que entre 6 (88,8%) e 10 (76,7%) minutos de reação não houve variação significativa na fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído.

A partir da Figura 2 pode-se observar que a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído é tempo-dependente, e que, após 10 minutos de reação, houve um declínio significativo na intensidade da fluorescência.

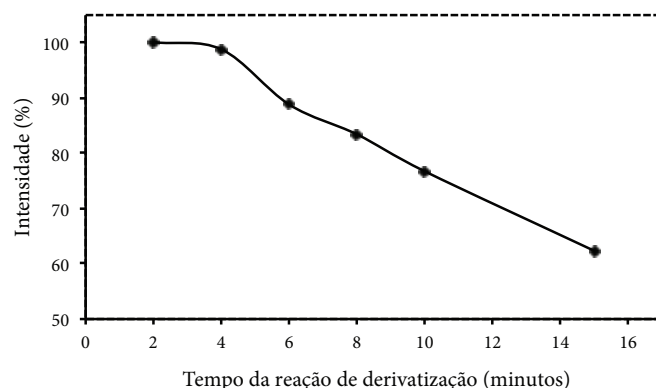


Figura 2. Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído em diferentes tempos da reação de derivatização

Entretanto, alguns estudos demonstraram estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído em tempos maiores de reação de derivatização. Em estudo com amostras de milho, Rice et al.<sup>34</sup> relataram que não houve diferença significativa nas áreas dos picos cromatográficos quando a reação de derivatização foi conduzida entre 2 e 40 minutos, obtendo resposta máxima do detector em 10 minutos de reação, e um declínio linear nas áreas dos picos com o aumento dos tempos de reação, até atingindo 70 minutos de reação.

Williams et al.<sup>27</sup> reportaram que, em reação de derivatização à 4 °C, o derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído permaneceu estável por até 24h, demonstrando influência positiva da temperatura da reação de derivatização sobre a estabilidade dos derivados, assim sugerindo a refrigeração dos derivados por até 24h, quando não há a possibilidade da realização das injeções cromatográficas naquele momento da análise.

Variando o tempo da reação de derivatização de 1 a 60 minutos e com o mínimo de exposição à luz, Samapundo et al.<sup>37</sup> verificaram maior resposta do detector de fluorescência em 8 minutos de reação, a qual não diferiu significativamente das obtidas nos tempos de reação entre 4 e 15 minutos. Entretanto, nos extremos, entre 1 e 2 minutos, e de 30 a 60 minutos, observaram-se respostas do detector significativamente menores.

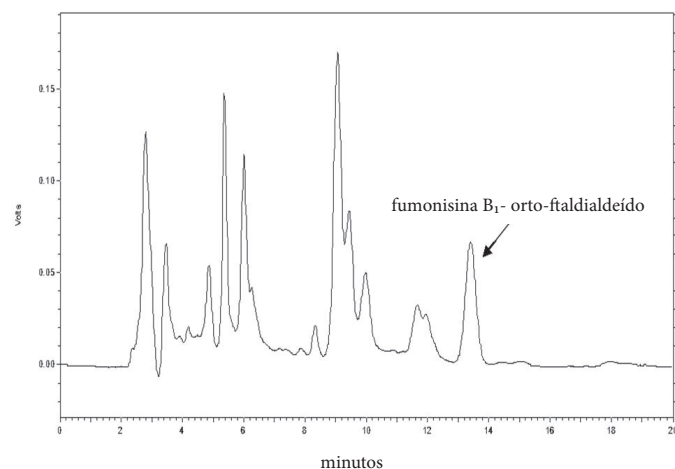
Os resultados do presente estudo, juntamente com os dados da literatura, indicam que o tempo de reação pode variar de acordo com as condições em que é realizada a derivatização, como a presença de luz e temperatura, sendo imprescindível o estabelecimento do tempo ótimo para a reação, no qual se observa a intensidade máxima da fluorescência, a fim de assegurar a reprodutibilidade do método.

## Análise Cromatográfica

### *Influência do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M*

As fumonisinas apresentam comportamento iônico em solução, e a sua separação em colunas de fase reversa envolve mecanismos tanto de fase reversa quanto de troca iônica. No entanto, em solventes neutros e não tamponados, as fumonisinas não eluem convenientemente nessas colunas, e as melhores resoluções cromatográficas são obtidas em fase móvel acidificada. Assim, na fase móvel, a solução tampão fosfato deve apresentar pH suficientemente ácido para garantir a supressão da ionização dos ácidos carboxílicos presentes na molécula de fumonisina B<sub>1</sub><sup>19,38</sup>.

Mantendo as condições pré-estabelecidas, vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10 µL, e fase móvel em eluição isocrática na proporção de 44:56, não foi possível a separação do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído empregando solução tampão fosfato 0,1 M em pH 2,3. No entanto, com a variação de 0,5 unidade no valor do pH, já foi possível a separação do pico cromatográfico dos possíveis interferentes da reação de derivatização no tempo de retenção de 13,5 minutos, além da obtenção de picos cromatográficos bem definidos, ou seja, mais estreitos, sem cauda frontal e ombro (Figura 3). Porém, a intensidade da fluorescência do derivado em pH 2,8 (61,4%) foi significativamente menor que a emitida em pH 3,3.



**Figura 3.** Cromatograma característico da separação e detecção do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna: 20 °C, volume injetado: 10 µL, e coluna ODS Hypersil de 250 × 4,6 mm d.i. e partículas de 5 µm

O emprego da solução tampão fosfato de sódio em pH 3,3 resultou em máxima fluorescência e em menor coeficiente variação, 1,2%. Na análise de fumonisina B<sub>1</sub> em alimentos, principalmente milho e seus derivados, tem sido amplamente utilizada solução tampão fosfato de sódio, como um dos solventes da fase móvel, com pH ajustado a 3,3 ou 3,35 com ácido fosfórico<sup>19,26</sup>.

A variação no pH de 3,3 a 3,8 resultou em redução de 3,7% na intensidade da fluorescência, porém não significativa. Entretanto, com a utilização na fase móvel de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M em valores de pH mais elevados (4,3 e 4,8), nas condições pré-estabelecidas, não foi possível a detecção do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído.

Samapundo et al.<sup>37</sup>, em estudo sobre a influência de diferentes parâmetros experimentais sobre a fluorescência do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído verificaram que o pH da fase móvel (metanol:solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, 3:1) influenciou significativamente sobre a resposta do detector. Em pH 2,85, observou-se a menor resposta do detector, enquanto no pH 3,85 a resposta do detector foi significativamente maior que em pH 3,35.

Variando o pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M em 0,5 unidade, observou-se que o derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído é estável na faixa entre 3,3 e 3,8, sendo fundamental o controle do pH da solução tampão empregada como fase móvel, a fim de obter-se picos cromatográficos bem definidos e a máxima fluorescência emitida pelo derivado.

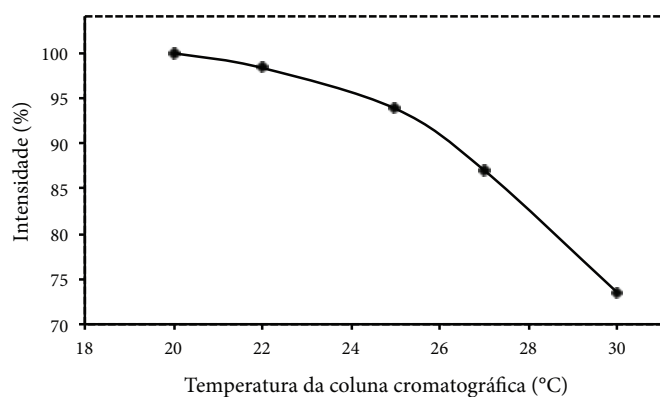
### *Influência da temperatura da coluna cromatográfica*

Em estudo sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído em diferentes temperaturas durante as análises cromatográficas, Samapundo et al.<sup>37</sup> relataram possível instabilidade térmica do derivado com o aumento da temperatura de 22 °C para 35 °C. Entretanto, na literatura, para a determinação de fumonisina B<sub>1</sub> por CLAE com detecção de fluorescência, tem-se empregado temperaturas de 23 °C<sup>26</sup>, 24 °C<sup>39</sup>, 30 °C<sup>40</sup> e 40 °C<sup>36</sup> durante as análises cromatográficas. Assim, o presente estudo avaliou a influência da temperatura da coluna cromatográfica sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-*orto*-ftaldialdeído.

A Figura 4 apresenta as temperaturas da coluna cromatográfica avaliadas e a intensidade da fluorescência. Ao variar a temperatura da coluna de 20 a 30 °C, verificou-se redução na intensidade da

fluorescência com o aumento da temperatura. Em análise cromatográfica a 20 °C, obteve-se a intensidade máxima e baixo coeficiente de variação, 3,9%, porém esta não diferiu significativamente da emitida a 22 °C (98,3%), 25 °C (93,8%) e 27 °C (87%), demonstrando estabilidade térmica do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído na faixa entre 20 e 27 °C.

No entanto, durante as análises a 30 °C, verificou-se redução significativa em 26,5% na intensidade da fluorescência, em relação a 20 °C, demonstrando a instabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído em temperaturas acima de 27 °C.



**Figura 4.** Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído em diferentes temperaturas da coluna cromatográfica

A partir da Figura 4, é possível visualizar a influência da temperatura da coluna cromatográfica sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído, indicando que as análises cromatográficas devam ser realizadas entre 20 °C e 27 °C.

Williams et al.<sup>27</sup>, ao estudarem o efeito da temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído, relataram redução em 40% e 90% na fluorescência do derivado a 4 °C e 24 °C, respectivamente, após 48 horas de derivatização, e que esta instabilidade pode ser atribuída à ausência do grupo hidroxila na posição C1 da molécula de fumonisina B<sub>1</sub>, grupo que está presente na molécula da esfinganina, cujo derivado esfinganina-orto-ftaldialdeído demonstrou-se estável por até 24 horas à temperatura de 24 °C.

## CONCLUSÃO

O derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído manteve-se estável em solução de tetraborato de sódio 0,1 M na faixa de pH entre 8,0 e 10,0, e de 2 a 8 minutos de

reação, durante a derivatização pré-coluna. Nas análises cromatográficas, verificou-se a estabilidade do derivado com o emprego na fase móvel de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M na faixa de pH entre 3,3 e 3,8, e temperatura da coluna cromatográfica de 20 a 27 °C. Assim, torna-se imprescindível o controle dos parâmetros experimentais pH, tempo e temperatura durante a reação de derivatização e as análises cromatográficas, a fim de assegurar a estabilidade do derivado fumonisina B<sub>1</sub>-orto-ftaldialdeído e a obtenção de resultados fidedignos sobre a contaminação dos alimentos por fumonisina B<sub>1</sub>.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor (processo n° 130387/2009-6) e pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Commun*. 1988;11:743-5.
2. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R, et al. Fumonisins: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(7):1806-11.
3. Sydenham EW, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J Agric Food Chem*. 1990;38(10):285-90.
4. Tanaka K, Sago Y, Zheng Y, Nakagawa H, Kushiro M. Mycotoxins in rice. *Int J Food Microbiol*. 2007;119:59-66.
5. Seefelder W, Knecht A, Gobmann M, Kleta S, Büttner C, Humpf HU. Occurrence of fumonisins in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) from Germany. *Mycotoxin Res*. 2004;20:29-30.
6. Park JW, Kim EK, Shon DH, Kim YB. Natural co-occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Addit Contam*. 2002;19(11):1073-80.
7. Kawashima LM, Vieira AP, Valente Soares LM. Fumonisins B<sub>1</sub> and ochratoxin A in beers made in Brazil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):317-23.
8. Heperkan D, Karbancioglu-Güler F, Oktay HI. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxin, cyclopiazonic acid, fumonisin and ochratoxin A in dried figs. *Food Addit Contam Part A*. 2011;1-10.
9. Gazzotti T, Lugoboni B, Zironi E, Barbarossa A, Serraino A, Pagliuca G. Determination of fumonisin B<sub>1</sub> in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Control*. 2009;20:1171-4.
10. Weidenbömer M. Foods and fumonisins. *Eur Food Res Technol*. 2001;212:262-73.

11. Lino CM, Silva LJG, Pena AS. Fumonisinas: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Rev Port Ciênc Vet*. 2004;99(552):181-92.
12. International Agency for Research on Cancer – IARC. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-102. List of classifications by alphabetical order. França; 2011. [acesso 2012 fev 2]. Disponível em: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf].
13. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AM. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium verticillioides*. *J Biol Chem*. 1991;266:1486-90.
14. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shepard GS, Van Schalkwyk DJ. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathol*. 1992;82:353-7.
15. Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisina B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(3):847-52.
16. Franceschi S, Bidoli E, Baron AE, La Vecchia C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:1407-11.
17. Shephard GS, Marasas WFO, Leggott NL, Yazdanpanah H, Rahimian H, Safavi N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *J Agric Food Chem*. 2000;48(5):1860-4.
18. Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill Jr AH, Rothman KJ, et al. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ Health Perspect*. 2006;114(2):237-41.
19. Lino CM, Silva LJG, Pena AS. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. *Quím Nova*. 2006;29(2):293-9.
20. Krska R, Welzig E, Boudra H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;137:241-64.
21. Scott PM, Lawrence GA. Liquid Chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J AOAC Int*. 1992;75(5):829-34.
22. Holcomb M, Thompson Jr. HC, Hankins LJ. Analysis of Fumonisin B<sub>1</sub> in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOc and fluorescence detection. *J Agric Food Chem*. 1993;41:764-7.
23. Ware GM, Francis O, Kuan SS, Umrigar P, Carman A, Carter L, et al. Determination of fumonisin B<sub>1</sub> in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Lett*. 1993;26(8):1751-70.
24. Velázquez C, van Bloemendal C, Sanchis V, Canela R. Derivation of Fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> with 6-Aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *J Agric Food Chem*. 1995;43:1535-7.
25. Shephard GS. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J Chromatogr A*. 1998;815:31-9.
26. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg (MD): AOAC; 2005.
27. Williams LD, Meredith FI, Riley RT. Fumonisin-ortho-phthalaldehyde derivatate is stabilized at low temperature. *J Chromatogr B*. 2004;806:311-4.
28. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
29. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Snijman PW, Van Schalkwyk DJ. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *J AOAC Int*. 1996; 79(3):688-96.
30. Arranz I, Baeyens WRG, Van Der Weken G, De Saeger S, Van Peteghem C. Review: HPLC Determination of Fumonisin Mycotoxin. *Cr Rev. Food Sci Nutr*. 2004;44:195-203.
31. Pagliuca G, Zironi E, Ceccolini A, Matera R, Serrazanetti GP, Piva A. Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B<sub>1</sub> and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr B*. 2005;819:97-103.
32. Tardieu D, Aubry A, Bluteau C, Bailly JD, Guerre P. Determination of fumonisin B<sub>1</sub> in animal tissues with immunoaffinity purification. *J Chromatogr B*. 2008;870:140-4.
33. Camargos SM, Machinski Jr M, Valente Soares LM. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em milho. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1999;58(2):71-9.
34. Rice LG, Ross PF, Dejong J. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. *J AOAC Int*. 1995;78(4):1002-9.
35. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in foods and feeds. *J AOAC Int*. 1992;75(2):313-8.
36. Thakur RA, Smith JS. Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J Agric Food Chem*. 1996;44(4):1047-52.
37. Samapundo S, De Meulenaer B, De Muer N, Debevere J, Devlieghere F. Influence of experimental parameters on the fluorescence response and recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B<sub>1</sub>. *J Chromatogr A*. 2006;1109:312-6.
38. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J L Chromatogr*. 1990;13(10):2077-87.
39. Almeida AP, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega E, Corrêa B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem*. 2002;50:3877-82.
40. Batatinha MJM, Simas MMS, Botura MB, Bitencourt TC, Reis TA, Corrêa B. Fumonisins in brewers grain (barley) used as dairy cattle feed in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*. 2007;18:608-12.

# Contaminação fúngica no leite humano e em sítios anatômicos de lactantes e lactentes

## Fungal contamination in human milk and in the anatomic sites of breastfeeding mothers and infants

RIALA6/1489

Geraldo dos Santos OLIVEIRA<sup>1</sup>, Rosa Helena LUCHESE<sup>2\*</sup>, Franz Reis NOVAK<sup>3</sup>, Daniel Paiva Barros de ABREU<sup>4</sup>, Amanda Mattos Dias MARTINS<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 07, CEP: 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: rhluche@ufrj.br

<sup>1</sup>Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz

<sup>3</sup>Laboratório de Controle de Qualidade de Leite Humano, Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Recebido: 09.06.2012 – Aceito para publicação: 05.09.2012

### RESUMO

As infecções bacterianas ou fúngicas causam quadro clínico de mastite, que motiva desmame precoce. Os micro-organismos patogênicos, como leveduras do gênero *Candida*, quando em número elevado no intestino, podem causar disbiose. Nesta pesquisa, foram realizadas a detecção e a identificação de microbiota fúngica nas amostras de leite humano e de sítios anatômicos de mulheres e crianças atendidas pelo Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira. A virulência dos isolados de levedura foi determinada pelos testes de atividade proteolítica. De 64 amostras analisadas, 81% foram positivas para fungos, com maior prevalência de *Candida albicans* (73%), seguida do complexo *C. parapsilosis* (15,4%). Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados nas amostras de leite, nas mamas e na cavidade oral, sugerindo-se a ocorrência de associação entre a infecção cutânea da mãe e do lactente com o leite ingerido. O perfil associado à virulência dos isolados de *Candida* foi determinado pelo teste de produção de proteases, e 100% das amostras mostraram resultados fortemente positivos, indicando alto grau de infecciosidade. A alta prevalência de *C. albicans* nas amostras coletadas de mamas, no leite e na cavidade oral, é importante fator de risco à saúde de lactentes.

**Palavras-chave.** mastite, cavidade oral, *Candida albicans*, complexo *C. parapsilosis* (grupo *psilosis*), virulência.

### ABSTRACT

Bacterial or fungal infections might produce a clinical feature of mastitis, which is one of the main causes of precocious breast-feeding discontinuity. In addition, when the potentially pathogenic microorganisms as yeast of *Candida* genera were in high counting in the intestine, might cause dysbiosis. This study aimed detecting and identifying fungi in human milk and anatomical sites of breast-feeding women and infants who were enrolled at Human Milk Bank of the Institute Fernandes Figueira. The virulence of the yeast isolates was evaluated by means of proteolytic activity tests. Eight-one percent of 64 analyzed samples showed positive results to fungi, with a highest prevalence of *Candida albicans* (73%) followed by *C. parapsilosis* complex (15.4%). Similar profiles were found in samples of milk, of breasts and of infants mouth cavity, suggesting a correlation between breast-feeding mothers and infants cutaneous infections with the ingested milk. The virulence of the isolated *Candida* was determined by the proteolytic activity test. All of the isolates (100%) were strongly positive, indicating a high degree of infectivity. The high prevalence of *C. albicans* in samples collected from breasts, mouth cavity and milk is a crucial risk factor for the infants health.

**Keywords.** mastitis, mouth cavity, *Candida albicans*, *C. parapsilosis* complex (*psilosis* group), virulence.

## INTRODUÇÃO

Infecções cutâneas e de partes moles causadas por espécies de fungos, como as dermatofitoses e dermatomicoses, são bastante comuns. Aquelas causadas por espécies do gênero *Candida* nas mamas das nutrizes tendem a ser manifestar como lesão eritematosa e pruriginosa no sulco inframamário, levando ao quadro conhecido por mastite. Essa é uma das principais causas de abandono precoce de amamentação, com consequências nefastas à saúde do lactente, incluindo sua exposição a fungos patogênicos<sup>1,2</sup>.

Diversas espécies de *Candida* são naturalmente encontradas vivendo como comensais no organismo de indivíduos com sistema imunológico normal, numa proporção de 47% na cavidade oral, 34% na região retal e 23% na cavidade vaginal, sem causar infecções aos seus hospedeiros, ainda que, por vezes, sejam detectadas em número elevado<sup>3</sup>. Isolados de *C. parapsilosis* previamente classificadas como pertencentes aos grupos II e III foram recentemente reclassificadas como espécies independentes, denominadas *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*<sup>4</sup>. De Toro et al.<sup>4</sup> estudaram 122 isolados do complexo *C. parapsilosis*, e classificaram 91% como sendo *C. parapsilosis sensu stricto*. A espécie isolada com mais frequência do trato gastrointestinal é *Candida albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*<sup>5-8</sup>. *C. albicans* é um importante comensal da microbiota de humanos e animais, mas é também o principal fungo patogênico de humanos, considerado o quarto entre os micro-organismos responsáveis por infecções sistêmicas de origem hospitalar<sup>9,10</sup>. Micro-organismos potencialmente patogênicos, como leveduras do gênero *Candida*, também podem estar presentes em número elevado em caso de disbiose intestinal<sup>9</sup>.

A produção de aspartil proteinase (Sap), assim como a produção de fosfolipase, está correlacionada com a habilidade de aderência ao tecido do hospedeiro<sup>11-16</sup>, incluindo adesão às proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina e colágeno<sup>17-19</sup>. Pela formação de tubo germinativo, podem aumentar o potencial de virulência nas infecções em mucosas e pele e na disseminação endovenosa<sup>20</sup>.

Tendo em vista a importância da alimentação com leite humano para a saúde do lactente, esta pesquisa

objetivou detectar e identificar a microbiota fúngica de leite humano e de sítios anatômicos de mulheres e crianças atendidas pelo banco de leite humano do Instituto Fernandes Figueira da Fiocruz.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras

Foram avaliadas um total de 64 amostras, sendo 25 de leite humano ordenhado e 39 de *swabs* de sítios anatômicos de lactentes e lactantes atendidos pelo banco de leite humano ordenhado do Instituto Fernandes Figueira (IFF). Dos lactentes, coletaram-se 18 amostras da cavidade oral, enquanto que, das lactantes, foram amostradas as mamas (mamilo e aréola), num total de 21.

Das 25 amostras de leite humano ordenhado cru, 18 foram provenientes das mesmas lactantes das quais foram coletados *swabs* das mamas, aréolas e da boca dos seus respectivos lactentes. Outras sete amostras de leite foram de doadoras voluntárias do banco de leite Humano do IFF.

Só foram incluídos no estudo as lactantes e os recém-nascidos cujos pais concordaram em participar por meio de consentimento livre e devidamente esclarecidos a despeito de alguma doença de base.

### Exame microscópico direto

Inicialmente, as amostras de leite foram centrifugadas por 15 minutos a  $3.000 \times g$  e o sedimento examinado “a fresco” ao microscópio. Nas amostras de *swabs*, foram feitos esfregaços e corados pelo método de Gram e analisados ao microscópio.

### Exame por cultivo

Amostras de leite (após centrifugação) e *swabs* foram semeados por estriamento em meio Sabouraud (Difco) e Mycosel® (BD-BBL) e, após o crescimento, foram reisoladas em meios especiais, ágar batata dextrose (Difco) e Lactrimel, preparados de acordo com Sidrim e Moreira<sup>21</sup>. Culturas presuntivas para leveduras foram semeadas em ágar extrato de arroz (Rice Extract Ágar, Difco) para prova do tubo germinativo e formação de clamidoconídeos. Além dos testes morfológicos, os isolados de leveduras foram identificados por meio de testes bioquímicos com o auxílio do equipamento VITEK® (bioMérieux, França) e por semeadura em CHROMágar *Candida*® (BD-BBL).

### Análise de virulência

Os isolados de leveduras foram testados para atividade de proteinase utilizando ágar proteinase preparado de acordo com Ruchel et al.<sup>11</sup>. Inoculou-se uma alçada de cada isolado no centro da placa de Petri contendo ágar proteinase seguida de incubação a 36 °C por quatro dias. A presença da enzima foi observada pela formação de um halo transparente devido à hidrólise da proteína ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com Price et al.<sup>22</sup> (Tabela 1), calculando-se a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo transparente de hidrólise.

**Tabela 1.** Interpretação da atividade enzimática para avaliação do grau de virulência conforme estabelecido por Price et al.<sup>22</sup>

Pz	Atividade enzimática	Código
= 1,0	Negativa	1
≥ 0,64 < 1,0	Positiva	2
< 0,64	Fortemente positiva	3

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Exame microscópico direto

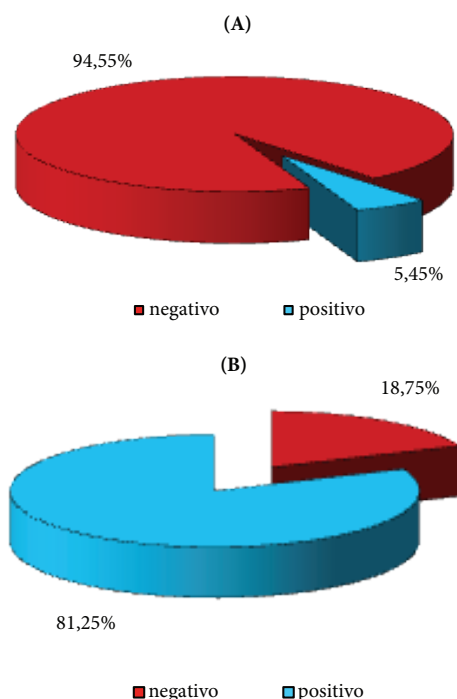
O exame microscópico direto revelou apenas 5,4% de positividade. Por outro lado, quando as amostras foram semeadas em meio de cultivo, 81% apresentaram contaminação fúngica (Figura 1), sugerindo que o exame microscópico direto não pode ser empregado como única forma de diagnóstico.

### Identificação e ocorrência de espécies fúngicas

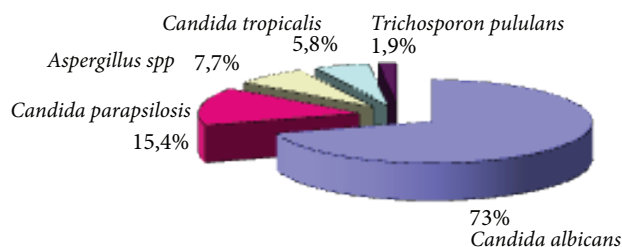
O percentual das diferentes espécies encontradas no total de amostras contaminadas com fungos é mostrado na Figura 2. *C. albicans* seguida do complexo *C. parapsilosis* predominaram no total de amostras positivas. De maneira similar, outros autores também observaram dominância de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* em sítios anatómicos e fungemias<sup>5-8,23-26</sup>. Foi verificado que mulheres que amamentam com dor no mamilo são mais frequentemente diagnosticadas como portadoras de candidíase por *C. albicans* que mulheres que amamentam sem dor<sup>2</sup>. Da mesma forma, Andrews et al.<sup>1</sup> encontraram *C. albicans* mais frequentemente em mães que amamentam e relatam dor quando comparadas a mães assintomáticas.

Krcméry e Kovacicová<sup>26</sup> verificaram em um período de dez anos que, embora *C. albicans* permaneça como a espécie mais frequentemente isolada, houve aumento de outras espécies de *Candida* em 46,3%, de

1991 a 1998. *C. albicans* representou 61,6% de todas as fungemias, seguidas de *C. parapsilosis* (9,9%), *C. krusei* (5,8%), *C. tropicalis* (4,1%), *C. glabrata* (3,2%), *C. guilliermondii* (1,2%) e *C. lusitaniae* (0,9%). Na presente pesquisa, foram encontrados, 73% de *C. albicans*, 15,4% do complexo *C. parapsilosis* e 5,8% de *C. tropicalis*, sendo que fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* representaram a terceira espécie fúngica de maior incidência (7,7%). Quando são consideradas apenas as amostras de leite, fungos do gênero *Aspergillus* representaram a segunda espécie mais incidente (15,8%), juntamente com o complexo *C. parapsilosis*.



**Figura 1.** Percentuais de positividade para a presença de fungos pelo exame microscópico direto (A) e por cultivo (B) do total de 64 amostras coletadas de leite humano e swabs de sítios anatómicos de lactentes e lactantes



**Figura 2.** Percentual de diferentes espécies fúngicas encontradas no total de 52 amostras positivas (81,25%)



Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados no leite, nas mamas e na cavidade oral (Figura 3), sugerindo uma transferência da infecção das mamas das lactantes para o leite e, conseqüentemente, para os lactentes.

Por outro lado, leveduras do gênero *Trichosporon* foram encontradas somente no leite, indicando contaminação proveniente do ambiente e/ou manipulação.

Segundo Contreras et al.<sup>27</sup>, *C. albicans* representou 40% dos isolamentos (23,3% em crianças saudáveis e 82,4% naquelas com candidíase bucal) de 124 crianças acompanhadas longitudinalmente, dos 15 dias de vida até os 16 meses. Assim, a combinação destas duas características de *C. albicans*, alta incidência e longa permanência, podem comprometer severamente a sanidade de lactentes.

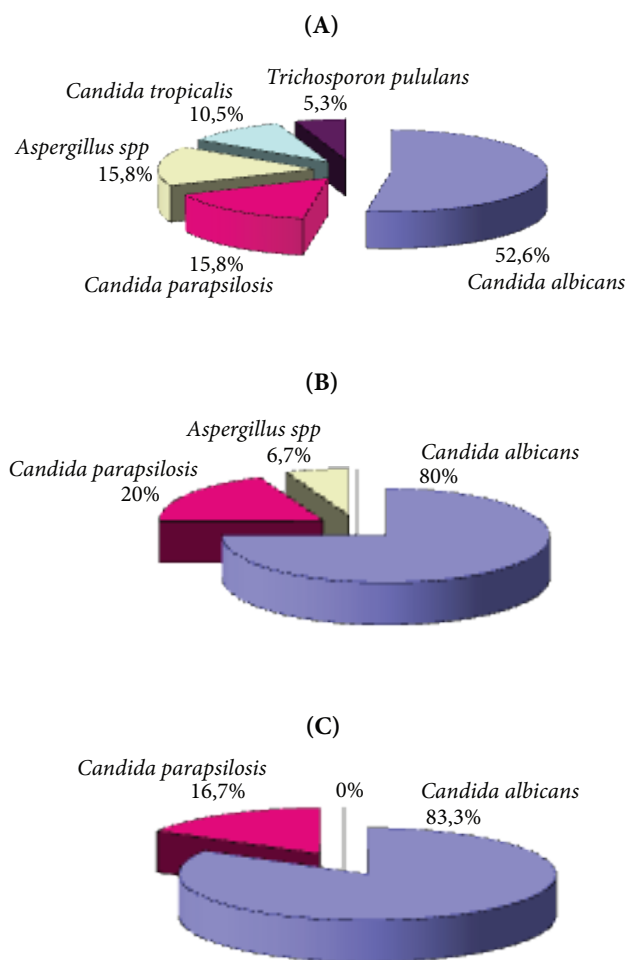
Tortora et al.<sup>28</sup> afirmaram que a microbiota da mucosa da boca usualmente suprime o crescimento de fungos como *C. albicans*. Entretanto, neste estudo, todas as amostras da cavidade oral foram positivas para fungos, com predominância de *C. albicans* (83,3%). De outra forma não foram encontradas as leveduras *C. tropicalis* e *T. pululans* presentes no leite.

Embora muitos membros desse gênero sejam encontrados intraoralmente (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*), eventualmente causam doença, sendo a candidíase bucal provocada mais frequentemente por *C. albicans*, considerada a mais patogênica<sup>29-31</sup>.

Almeida<sup>32</sup> observou a ocorrência de bolores e leveduras em 69,4% das amostras de leite humano coletadas no IFF, com contagens na ordem de  $10^6$  UFC/mL. Foram efetuadas modificações na técnica de coleta e as contagens foram repetidas, revelando redução na incidência desses micro-organismos para 16,7% das amostras e contagens inferiores a  $3,0 \times 10^2$  UFC/mL.

A alta incidência de *C. albicans* nas mamas, cavidade oral de lactentes e no leite é uma fator de risco à sanidade dos lactentes. O gênero *Candida*, composto por leveduras comensais na pele humana e dos animais vertebrados, vem sendo estudado recentemente em várias reformulações a respeito de sua classificação, taxonomia e virulência, e com relação ao seu papel na doença cutânea e sistêmica<sup>33</sup>. Espécies de *Candida* estão relacionadas ao abandono da amamentação e quadros de diarreia apresentados por crianças internadas e alimentadas com leite

materno e leite maternizado, sobretudo em pacientes imunodeprimidos. Em adição, leveduras do gênero *Candida* são consideradas potencialmente patogênicas quando presentes em número elevado em casos de disbiose intestinal<sup>9</sup>.



**Figura 3.** Percentual de ocorrência de diferentes espécies fúngicas no leite humano (A), nas mamas das nutrizes (B) e na cavidade oral de lactentes (C)

### Produção de proteinase

Um dos fatores de virulência do gênero *Candida* mais estudado é a produção de enzimas extracelulares, como proteinases ácidas e fosfolipases, uma vez que exercem importante papel na patogênese. O perfil associado à virulência das espécies de *Candida* foi determinado pelo teste de produção de proteinase ácida, sendo observado que 100% foram fortemente positivas, indicando alto potencial de virulência. Foram testados

18 isolados de *C. albicans*, sendo seis das mamas, seis da cavidade oral e seis do leite, que apresentaram atividade enzimática (Pz) média e desvio-padrão de  $0,37 \pm 0,06$ ,  $0,42 \pm 0,11$  e  $0,35 \pm 0,10$ , respectivamente. De maneira similar, três isolados de *Candida* do complexo *psilosis* (respectivamente de mama, cavidade oral e leite) apresentaram Pz de 0,54, 0,38 e 0,45, e também foram classificados como fortemente positivos para produção de proteinases. Um isolado de leite de *C. tropicalis* foi igualmente fortemente positivo para o teste de proteinase (Pz 0,37).

Ruchel et al.<sup>11</sup> e MacDonald<sup>34</sup> demonstraram que atividades distintas de proteinases podem ser apresentadas por diferentes linhagens de *C. albicans* e diferentes espécies de *Candida*. Também foi observado que existe tendência de correspondência entre quantificação de proteinases e ordem de virulência de espécies (*C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. guilliermondii*). Diferentemente, os resultados aqui apresentados mostraram que todas as leveduras isoladas independentemente da espécie foram fortemente proteolíticas. Conclui-se que os isolados de *Candida* spp. podem ser considerados potencialmente oportunistas e/ou patogênicos.

Resultados semelhantes foram relatados por Penha<sup>35</sup>, que observou elevada atividade proteolítica em 100% dos isolados de *C. albicans* de pacientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Candido et al.<sup>36</sup> relataram atividade proteolítica em 66,7% de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Holmstrup e Samaranayake<sup>37</sup> acreditam que o desequilíbrio da microbiota bucal e a imaturidade dos mecanismos de defesa são responsáveis pela sensibilidade aumentada à candidíase durante o período neonatal. Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a colonização por *Candida*, inicialmente superficial, pode se disseminar. A infecção por espécies do gênero *Candida*, segundo Ghannoum<sup>13</sup>, começaria pela aderência da levedura às células da pele e das mucosas, e seguiria com a multiplicação celular, formando posteriormente tubo germinativo e hifas que produziriam proteinases e fosfolipases, permitindo a sua penetração e a consequente resposta inflamatória.

## CONCLUSÃO

Todas as espécies de leveduras apresentaram elevada atividade de proteases e, portanto, com alto

potencial associado à virulência e potencial para tornarem-se patogênicas. Existe uma relação da infecção cutânea da mãe e do lactente, assim como do leite ingerido, indicando alto grau de infectividade dessas leveduras. Conclui-se que o aspecto higiene é fundamental quando da entrega da alimentação ao recém-nascido, seja por meio da amamentação por fórmulas ou ao peito.

## REFERÊNCIAS

1. Andrews JI, Fleener DK, Messer SA, Hansen WF, Pfaller MA, Diekema DJ. The yeast connection: is *Candida* linked to breastfeeding associated pain? *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(4):424e1-4.
2. Panjaitan M, Amir, LH, Costa AM, Rudland E, Tabrizi S. *Breastfeed Med*. 2008;3(3):185-7
3. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Amer Acad Dermatol*. 1994;31(3):S2-S5.
4. De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(3):418-24.
5. Furlaneto-Maia L, Specian AFL, Thörn DSW, Oliveira MT. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. *Acta Sci Health Sci*. 2007;29(1):33-7.
6. Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press; 1995. p. 85-93.
7. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gees, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis* sp. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16:72-6.
8. Vargas KG, Joly S. Carriage Frequency, intensive of Carriage, and Strains of Oral Yeast Species Vary in the Progression to Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):341-50.
9. Sgarbieri, V. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutrição*. 2004;17(4):397-409.
10. Bounoux ME, Aanensen DM, Morand S, Théraud M, Spratt BG, d'Enfert C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol*. 2004;4(3):243-52.
11. Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinase from different stains of *Candida albicans*. *Saborandia*. 1982;20:233-4.
12. Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC. Genetic characterization of phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiol*. 1998;144:55-72.
13. Ghannoum MA. Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):124-34.
14. Hanula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidiasis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(4):238-44.
15. Bein M, Scaller M, Hans CK, Baur S, Hamm G, Monod M, et al. The secreted aspartyl proteinase sap1 and sap2 cause tissue damage in an vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun*. 2003;71(6):3227-34.

16. Alvares CA, Suidzzinski TE, Lopes MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;41(5):319-27.
17. Hoyer LL. The ALS Gene Family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(4):176-80.
18. Goes VFF. Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas Mediciniais sobre a formação do biofilme em *Candida* ssp. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Unicamp; 2009.
19. Tronchin G, Bouchara IP, Annaix V, Robert T, Senet JM. Fungal cell adhesion in *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol*. 1991;7:23-33.
20. Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, Sanglaard D, Merker R, Schoroder M, et al. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun*. 1999;67(12):6637-42.
21. Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1999.
22. Price FM, Genetrays IO, Wclacinson IP. Plate method for detection for phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabourandia*. 1982;20:27-34.
23. Nucci M. Candiduria in hospitalized patients: A review. *Bras J Infec Dis*. 2000;4:168-72.
24. Rodriguez-Tudella JL, Cuenca-Estrella M. Fungemia by yeast: a multicenter study in Spain. *Rev Clin Esp*. 1999;199:356-61.
25. Morgan J. Global trends in candidemia: Review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep*. 2005;7:429-39.
26. Krcmery V Jr., Kovacicová G. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: Trends in etiology in 310 episodes. The Slovak Fungaemia Study Group *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36:7-11.
27. Contreras I, Ponton J, Quindos G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin Infect Dis*. 1994;18(3):480-1.
28. Tortora GF, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000.
29. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy and profilaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1):61-9.
30. Neville BW, Dann DD, Allen CM, Bouquot JE. Fungal and Protozoal diseases. *In: Oral & Maxillofacial pathology*. Filadélfia; 1995.
31. Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia oral e imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1997.
32. Almeida JAG. Qualidade do leite humano coletado e processado em banco de leite [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1986.
33. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts, a taxonomic study*. 5. ed. San Diego (CA): Elsevier; 2011. 2080 p.
34. MacDonald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sobouraudia*. 1984;22(1):79-82.
35. Penha SS. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients with and without denture stomatitis. *Pesq Odont Bras*. 2000;14(2):119-22.
36. Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(5):437-42.
37. Holmstrup P, Samaranayake LP. Acute and AIDS related oral candidoses. *In: Samaranayake LP, Mac Farlane TW. Oral Candidosis*. London: Wright; 1990. cap. 8, p. 133-55.

## Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango

### Use of Bolton broth for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses

RIALA6/1490

Valeria de Mello MEDEIROS<sup>1</sup>, Silvia Maria Lopes BRICIO<sup>1</sup>, Ana Luzia Lauria FILGUEIRAS<sup>2</sup>, Maysa Beatriz Mandetta CLEMENTINO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Avenida Brasil, 4.365, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: (21) 3865-5161. E-mail: valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br

<sup>2</sup>Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Setor de *Campylobacter*, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Recebido: 14.07.2011 – Aceito para publicação: 16.05.2012

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o enriquecimento seletivo e o plaqueamento direto no isolamento das espécies termofílicas de *Campylobacter* spp. em 30 amostras de carcaças de frango resfriadas adquiridas em supermercados, feiras livres e abatedouros no município do Rio de Janeiro, no período de julho de 2009 a julho de 2010. Foi realizada a enxaguadura da carcaça com água peptonada tamponada a 1% para recuperação das bactérias. Para o plaqueamento direto, foram utilizados ágar carvão cefoperazone desoxicolato modificado e ágar campy-cefex. Para o enriquecimento seletivo, foi empregado o caldo Bolton em concentrações simples e dupla. Foi detectada a presença de *Campylobacter* spp. em 21 amostras (70%), sendo 6 (28,6%) de abatedouros (3 com Serviço de Inspeção Estadual e 3 sem inspeção), 8 (38,1%) de supermercados e 7 (33,3%) de feiras livres. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nesses estabelecimentos. As 21 amostras positivas foram isoladas do plaqueamento direto, 2 (9,5%) foram isoladas também no caldo Bolton simples e nenhuma no caldo Bolton duplo. O plaqueamento direto foi considerado o método mais rápido e eficiente, e apresenta menor custo que o enriquecimento seletivo na recuperação de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango.

**Palavras-chave.** *Campylobacter* spp., caldo Bolton, mCCDA, Campy-Cefex.

#### ABSTRACT

This study aimed at comparing the use of selective enrichment and direct plating for isolating the thermophilic species of *Campylobacter* spp. from 30 samples of chilled chicken carcasses purchased in supermarkets, marketplaces and slaughterhouses in the Rio de Janeiro city, from July 2009 to July 2010. Chicken carcasses were rinsed out with 400 mL of 1% buffered peptone water for bacteria recovering. Charcoal Cefoperazone Deoxycholate agar and Campy Cefex agar were used for direct plating. Selective enrichment was performed employing Bolton broth in single and double concentrations. The presence of *Campylobacter* spp. was detected in 21 samples (70%), being 6 (28.6%) from slaughterhouses (3 with State inspection service and 3 without inspection), 8 (38.1%) from supermarkets and 7 (33.3%) from marketplaces. No statistically significant differences were found among the results obtained from different establishments. Of 21 positive samples, 2 (9.5%) were isolated from single Bolton broth and none of them was positive in double Bolton broth. Therefore, the direct plating was considered easier, faster and more cost-effective than the selective enrichment methodology for recovering *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses.

**Keywords.** *Campylobacter* spp., Bolton broth, mCCDA, Campy-Cefex.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas, as espécies de *Campylobacter* spp. têm sido reconhecidas como patógenos emergentes e despontaram como importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em várias partes do mundo<sup>1</sup>. Dados de países desenvolvidos apontam que as infecções causadas por algumas espécies do gênero *Campylobacter* têm sido relatadas como uma das principais causas de gastroenterites em grande parte dos países europeus<sup>2</sup>. Nos Estados Unidos, ocorrem cerca de 2,4 milhões de casos por ano<sup>3</sup>.

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteraceae* e é constituído de bastonetes delgados, curvos espiralados, gram-negativos e microaerófilos. Não formam esporos, não são hemolíticos e possuem uma motilidade característica em forma de saca-rolhas, produzida por um flagelo polar em uma ou ambas as extremidades da célula<sup>4</sup>. As espécies do gênero *Campylobacter* estão amplamente distribuídas na natureza, e a maioria está apta a habitar o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo encontradas frequentemente em aves domésticas, bovinos, suínos, ovinos, roedores, pássaros, cães e gatos<sup>5</sup>. *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas, devido à temperatura ótima de crescimento oscilar entre 42 °C e 43 °C, sendo que *C. jejuni* e *C. coli* constituem as espécies mais frequentemente isoladas de enterites humanas<sup>2,5</sup>.

A campilobacteriose no homem ocorre em decorrência da ingestão de alimentos imprópriamente manipulados ou mal cozidos. A grande maioria dos casos ocorre de forma isolada, com eventos esporádicos, não caracterizando um surto<sup>4</sup>. Os frangos são os maiores reservatórios dessas bactérias, e as espécies termofílicas estão mais associadas à doença, por suportar a temperatura do trato intestinal das aves, que é em torno de 41 °C. A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros e o consumo de alimentos à base de frango mal cozido, além da contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos crus, são considerados os principais fatores de risco para infecções<sup>5,6,7</sup>.

A doença é caracterizada por diarreia aguda, dor abdominal e cólica, podendo ocasionalmente ocorrer diarreia sanguinolenta contendo leucócitos e muco. Calafrios, náuseas e febre também representam uma sintomatologia da doença, mas os vômitos são raros. Um fator agravante na transmissão da doença é que

pacientes convalescentes podem continuar excretando o micro-organismo nas fezes durante duas semanas a um mês<sup>8</sup>. Infecções por *C. jejuni* podem levar a sérias consequências pós-infeciosas, dentre as quais se destaca a Síndrome de Guillain-Barré, que consiste em uma polineuropatia inflamatória desmielinizante, resultando em paralisia neuromuscular aguda<sup>2</sup>.

Esses organismos microaerófilos são mais exigentes e possuem crescimento mais lento que outros enteropatógenos bacterianos e requerem condições especiais de crescimento, uma vez que são sensíveis ao oxigênio, característica que dificulta o seu cultivo<sup>9</sup>. As células de *Campylobacter* spp. respondem ao estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, mudando a sua morfologia para formas cocoides, entrando em um estado viável não cultivável e sendo incapazes de crescer em meios seletivos de isolamento, mas podendo ser transmitidas e causar infecção em humanos<sup>10,11</sup>. Três fatores são fundamentais para o seu isolamento: o uso de meios seletivos, a incubação em atmosfera de microaerofilia e a temperatura de 42 °C no isolamento primário<sup>12</sup>.

O uso de suplementos, como sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, aumenta a aerotolerância do micro-organismo por meio da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxido. Muitos meios seletivos contêm alguns ou todos esses compostos em concentrações variadas<sup>12</sup>.

Existem vários métodos descritos para a pesquisa de *Campylobacter* em alimentos, incluindo ou não etapas de enriquecimento seletivo seguido de inoculação em ágar seletivos<sup>13</sup>. A maioria dos meios de enriquecimento para *Campylobacter* contém uma base rica em nutrientes, antibióticos para inibir competidores e ingredientes para amenizar os efeitos tóxicos do oxigênio<sup>12</sup>. O *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*<sup>5</sup> recomenda a utilização do plaqueamento direto e do enriquecimento seletivo com o caldo Bolton em concentração dupla, o *Bacteriological Analytical Manual*<sup>14</sup> e a Norma ISO 10.272-1:2006<sup>15</sup> recomendam a utilização do caldo Bolton em concentração simples.

O objetivo deste trabalho foi comparar o isolamento de *Campylobacter* spp. por plaqueamento direto e pela utilização de enriquecimento seletivo com caldo Bolton em concentração simples e dupla em carcaças resfriadas de frango.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram adquiridas trinta amostras de carcaças resfriadas de frango, de diferentes marcas comerciais oferecidas para consumo no Município do Rio de Janeiro, no período de julho de 2009 a julho de 2010. A coleta foi realizada no dia anterior ou no mesmo dia da análise, em três tipos de estabelecimentos comerciais: supermercados (n = 10), feiras livres (n = 10) e abatedouros (n = 10), sendo quatro com Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e seis sem inspeção. No momento da coleta, as amostras encontravam-se dentro das especificações (temperatura, validade, embalagem) estabelecidas pela legislação vigente para esse tipo de produto, definidas pela Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002<sup>16</sup>, com exceção das amostras de abatedouros sem inspeção e as adquiridas em feiras livres, que não possuíam rotulagem e não estavam refrigeradas.

As amostras foram transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo e mantidas entre 2–8 °C até o momento da análise. A análise das amostras foi realizada no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

### Preparo da amostra

A pesquisa de *Campylobacter* spp. foi realizada de acordo com a metodologia descrita no capítulo 31 do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*<sup>5</sup>, com a inclusão do caldo Bolton em concentração simples<sup>14,15</sup>.

No preparo inicial da amostra, foi utilizada a técnica da enxaguadura com um volume de 400 mL de água peptonada 1% tamponada.

### Plaqueamento direto

Foi realizado o plaqueamento por esgotamento em estria de uma alça bacteriológica diretamente da água da enxaguadura das amostras. Foram utilizadas placas em duplicata com os meios ágar Carvão Cefoperazone Desoxicolato modificado (mCCDA-Oxoid) e ágar Campy-cefex<sup>17</sup> (BBL), e incubados em atmosfera de microaerofilia utilizando o gerador CampyGen (Oxoid) a 42 °C por 48 horas.

### Enriquecimento seletivo

Foram utilizados 25 mL do caldo Bolton (Oxoid) em dupla concentração, com suplemento seletivo

contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida e 5% de sangue lisado de cavalo adicionado de 25 mL da água da enxaguadura. Em paralelo, foi utilizado 45 mL de caldo Bolton em concentração simples com os mesmos suplementos seletivos, adicionado de 5 mL da água da enxaguadura. Após a incubação a 42 °C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia, o crescimento de cada caldo foi semeado, com uma alça bacteriológica, em duas placas com os ágares descritos na etapa anterior.

Todas as etapas foram realizadas paralelamente com as cepas de *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 ATCC 33560 (controle positivo) e *Escherichia coli* INCQS 00033 ATCC 25922 (controle negativo), obtidos da coleção de culturas do INCQS.

### Identificação de *Campylobacter* spp.

Os isolados que apresentaram crescimento sugestivo de *Campylobacter* spp. foram submetidos à coloração de Gram e às provas bioquímicas de oxidase e catalase. A confirmação de gênero foi realizada pelo teste de aglutinação em látex utilizando o kit Dryspot *Campylobacter* (Oxoid).

### Análise estatística

As diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de supermercados (n = 10), feiras livres (n = 10) e abatedouros (n = 10) foram calculadas pelo teste de Cochran (bilateral) ao nível de significância de 0,05. A análise comparativa entre as técnicas de plaqueamento direto e enriquecimento seletivo e da recuperação entre os ágares mCCDA e campy-cefex foi determinada pelo teste de Fisher seguido do cálculo de Odds Ratio. Essas análises foram realizadas no programa Bioestat 5.0 (2007).

## RESULTADOS

### Isolamento de *Campylobacter* spp. por plaqueamento direto

O plaqueamento direto, a partir da água da enxaguadura, nos meios seletivos ágar campy-cefex e mCCDA, demonstrou a presença de *Campylobacter* spp. em 21 (70%) das carcaças de frango analisadas. Destes 21 isolados, 13 (62%) foram obtidas no ágar campy-cefex e mCCDA concomitantemente, 3 (14%) somente no campy-cefex e 5 (24%) somente no mCCDA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolamento de *Campylobacter* spp. em amostras de carcaças resfriadas de frango

Procedência das amostras	Enriquecimento seletivo (caldo Bolton simples)			Plaqueamento direto			Total de amostras positivas por meio de isolamento		Total de amostras analisadas
	+ mCCDA <sup>1</sup>	+ CC <sup>2</sup>	Amostras positivas	+ mCCDA	+ CC	Amostras positivas	+ mCCDA	+ CC	
Mercado	1	1	1	6	5	8	7	6	10
Abatedouro	0	1	1	5	3	6	5	4	10
Feira	0	0	0	6	6	7	6	6	10
Total	1	2	2 <sup>a</sup>	17	14	21 <sup>b</sup>	18	16	30

<sup>1</sup> ágar carvão cefoperazone desoxicolato modificado; <sup>2</sup> ágar Campy-Cefex; <sup>a,b</sup> valores significativamente diferentes (teste de Fisher,  $p < 0,0001$ ).

### Isolamento de *Campylobacter* spp. por enriquecimento seletivo

Das 21 amostras contaminadas com *Campylobacter* spp., somente 2 (9,5%) foram obtidas a partir do caldo Bolton simples e nenhuma do caldo Bolton em dupla concentração (Tabela 1). A etapa de enriquecimento seletivo com caldo Bolton nas concentrações simples e dupla seguida de esgotamento em ágar mCCDA e campy-cefex apresentou abundante crescimento de microbiota acompanhante.

### Identificação de *Campylobacter* spp.

A coloração de Gram demonstrou a presença de bastonetes Gram negativos, delgados e em forma de asas de gaivota nos 21 isolados, que também apresentaram a produção das enzimas catalase e oxidase. Os 21 isolados foram confirmados como *Campylobacter* spp. pelo teste de aglutinação em látex.

### Análise estatística

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de supermercados ( $n = 10$ ), feiras livres ( $n = 10$ ) e abatedouros ( $n = 10$ ). Das 21 amostras analisadas que apresentaram contaminação por *Campylobacter* spp., 8 (38,1%) foram provenientes de carcaças coletadas em supermercados, 7 (33,3%) em feiras livres e 6 (28,6%) em abatedouros. Das 6 amostras positivas obtidas em abatedouros, 3 foram de estabelecimento com SIE e 3, sem inspeção. Em relação ao plaqueamento direto e enriquecimento seletivo, foi demonstrado que as técnicas são significativamente diferentes (teste de Fisher,  $p < 0,0001$ ). O cálculo de Odds Ratio foi 30, ou seja, as chances de isolamento pelo plaqueamento direto foram 30 vezes superiores às chances de isolamento pelo enriquecimento seletivo. Na comparação da recuperação dos ágares mCCDA e campy-cefex, foi demonstrado que não houve diferença

significativa entre os referidos meios seletivos (teste de Fisher foi de 0,6965, ou seja,  $p > 0,05$ ).

### DISCUSSÃO

A recuperação de *Campylobacter* spp. em carnes resfriadas de frango depende da sensibilidade da metodologia adotada. Neste estudo, a recuperação de *Campylobacter* spp. foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) pelo método do plaqueamento direto em ágar campy-cefex e mCCDA, em relação ao enriquecimento seletivo. Enquanto a recuperação pelo plaqueamento direto detectou *Campylobacter* spp. em 70% (21/30) das amostras, o enriquecimento seletivo revelou a presença dos mesmos em apenas 6,6% (2/30). Resultado semelhante foi obtido por Medeiros<sup>18</sup>, que utilizou o plaqueamento direto em ágar mCCDA e o enriquecimento seletivo em caldo Bolton duplo e isolou 70% de *Campylobacter* spp. apenas por meio do plaqueamento direto. Outros autores também verificaram que a recuperação por plaqueamento direto em mCCDA foi significativamente superior (41%) comparada com o enriquecimento seletivo em caldo Bolton simples (24,2%)<sup>19</sup>.

Resultados contraditórios foram observados por Franchin et al.<sup>20</sup>, que conseguiram isolar *Campylobacter* spp. em 91,7% das amostras utilizando enriquecimento com o caldo Bolton em concentração simples, assim como Johnsen et al.<sup>21</sup>, que isolaram *Campylobacter* spp. em 100% das amostras de frango de corte analisadas utilizando o caldo Bolton seguido pelo isolamento no ágar mCCDA. Outro estudo, porém, demonstrou a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango pelos dois métodos, com exceção de duas carcaças que só apresentaram esses contaminantes após o enriquecimento em caldo Bolton<sup>12</sup>. Esse dado foi reforçado pela análise comparativa entre esses métodos, demonstrando que ambos foram homogêneos e sensíveis para detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de

carcaças de frango. Entretanto, devido à antecipação dos resultados em 24 horas, os autores recomendam a utilização do plaqueamento direto<sup>22</sup>.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram a presença de crescimento abundante de outras bactérias acompanhantes após o enriquecimento em caldo Bolton simples e duplo, o que prejudicou a visualização de colônias típicas de *Campylobacter* spp. Outros estudos confirmaram essa observação ao demonstrarem o crescimento excessivo de *Escherichia coli* e outras bactérias intestinais, após a utilização do caldo Bolton, mascarando a visualização das colônias de *Campylobacter* nas placas de ágar mCCDA<sup>23,24</sup>. Esse grupo de pesquisadores levantou a hipótese de que o caldo Bolton contém quantidades limitadas de compostos seletivos, sendo insuficiente para inibir a microbiota acompanhante de *Campylobacter* spp. em amostras muito contaminadas, uma vez que *Campylobacter* spp. têm uma taxa de crescimento menor que outras espécies bacterianas e são considerados fracos competidores fora do nicho intestinal<sup>19</sup>.

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os meios de isolamento utilizados. O mesmo foi observado em um estudo onde foram avaliados seis meios sólidos para detecção de *Campylobacter* e não foram verificadas diferenças significativas entre cinco deles, incluindo campy-cefex e mCCDA<sup>25</sup>. Os autores também observaram que a utilização de meios de isolamento contendo grande número de antibióticos como o ágar campy-line pode prejudicar a recuperação de *Campylobacter* spp.<sup>25</sup>.

Em relação aos locais de coleta, não houve diferença significativa no isolamento de *Campylobacter* spp. entre as amostras de feiras livres, hipermercados e abatedouros. Dados similares foram obtidos por outros autores a partir do isolamento de *Campylobacter* spp. em carcaças e miúdos de frango coletadas em abatedouros clandestinos, feiras livres e supermercados, e em sobrecoxas resfriadas provenientes de hipermercados e feiras livres, respectivamente<sup>26,27</sup>. Outra evidência foi a detecção de *Campylobacter* spp. em carne de frango oriunda de estabelecimentos contendo Serviço de Inspeção Federal ou Estadual<sup>28</sup>. Esses dados podem estar relacionados com os diferentes mecanismos de colonização e com a enorme variedade de fontes de *Campylobacter* spp.<sup>29</sup>. Outro fator que pode estar relacionado com esses dados é a presença de aves no abatedouro com penas e pele, contendo fezes devido à aglomeração durante o transporte. Essas aves carregam micro-organismos para o ambiente

de processamento, o que pode levar à contaminação cruzada. Esses são alguns dos fatores que podem justificar a detecção desses micro-organismos em diferentes tipos de produtos e estabelecimentos.

No que se refere à variabilidade na recuperação de *Campylobacter* spp., os resultados apresentados, acrescidos de dados da literatura, sugerem que os métodos de análise influenciam consideravelmente, uma vez que existem muitos fatores envolvidos no favorecimento e ou inibição do isolamento<sup>12,18-21</sup>. Percentuais superiores e inferiores àqueles encontrados nesta investigação têm sido relatados<sup>20,26,28,30</sup>. Fatores como a susceptibilidade às condições adversas como congelamento, aditivos, microbiota acompanhante e tensão de oxigênio podem interferir na recuperação de *Campylobacter* spp.<sup>30</sup>. Além disso, o aumento na concentração de cloro na água de processamento das aves, aliado à melhora das condições de higiene, promovem a diminuição da contaminação<sup>31,32</sup>. Por outro lado, algumas cepas podem apresentar resistência aos antimicrobianos usados na desinfecção e contaminar as carcaças durante o processamento<sup>33</sup>.

## CONCLUSÃO

O método do plaqueamento direto em meios seletivos mCCDA e campy-cefex foi superior na recuperação de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango em comparação com o enriquecimento seletivo. Por isso, o plaqueamento direto oferece resultados mais rápidos e de menor custo para os laboratórios.

Não foi verificada diferença significativa no isolamento de *Campylobacter* spp. entre os ágar mCCDA e campy-cefex. Em relação à procedência, não foram observadas diferenças significativas quanto à presença de *Campylobacter* spp. nos três locais de coleta. O mesmo ocorreu em relação aos estabelecimentos com inspeção sanitária ou isento desse serviço.

---

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o professor Sergio Alves da Silva pela valiosa colaboração na realização das análises estatísticas e ao Marcelo Luiz Lima Brandão pelas sugestões na finalização do artigo.

---

## REFERÊNCIAS

1. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:868-76.



2. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. *Vet Res*. 2005;36:351-82.
3. Viray M, Lynch M. *Campylobacter* Enteritis. Infectious diseases related to travel. Center for Diseases Control and Prevention; Yellow Book chap. 3; 2011 [acesso 2011 Out 11]. Disponível em: [http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/campylobacter-enteritis.htm].
4. Nachamkin I. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chap. 9, p. 179-92.
5. Stern NJ, Line JE, Chen HC. *Campylobacter* In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Washington (DC): APHA; 2001. Chap. 31, p. 301-10.
6. Rozynek E, Dzierzanowska-Frangat K, Jozwiak P. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J Med Microbiol*. 2005;54:615-9.
7. Rizal A, Kumar A, Vidyarthi AS. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. *Internet J Food Saf*. 2010;12:29-34. Disponível em: [http://www.internetjfs.org/articles/ijfsv12-5.pdf].
8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger, Winn Jr. WC. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro (RJ): Medsi; 2001.
9. Oyofe BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(10):2613-9.
10. Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002.
11. Lee MD, Newell DG. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis*. 2006;50:1-9.
12. Kuana SL, Santos LR, Rodrigues LB, Borsoi A, Kellermenn A, Salle CTP, et al. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. *Ciênc Anim Bras*. 2008;9(2):480-6.
13. Line JE. Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *J Food Prot*. 2001;64:1711-5.
14. Hunt JM, Abeyta C, Tran T. *Campylobacter*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. FDA CFSAN; 2001 [acesso 2010 nov 12]. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html].
15. International Organization for Standardization. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp.* 10272-1:2006. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. Central Secretariat, Geneva.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 21 set 2002, Seção 1.
17. Elsa AM, Jennifer AH. Media, Reagents and Stains. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington (DC): APHA; 2001. Chap. 63, p. 601-48.
18. Medeiros VM. Implantação de metodologia de pesquisa de *Campylobacter* spp. no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. [monografia especialização]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz; 2009.
19. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, De Zutter L. Baseline Data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(17):5483-9.
20. Franchin PR, Aidoo KE, Batista CRV. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz J Microbiol*. 2005;36:157-62.
21. Johnsen G, Kruse H, Hofshagen M. Genotyping of *Campylobacter jejuni* from Broiler Carcasses and slaughterhouse Environment by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Poult Sci*. 2006;85:2278-84.
22. Kuana SL, Santos LR, Beatriz Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. *Acta Sci Vet*. 2008b;36(1):21-4.
23. Jasson V, Sampers I, Botteldoorn N, López-Gálvez F, Baert L, Denayer S, et al. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *Int J Food Microbiol*. 2009;135:248-53.
24. Musgrove MT, Berrang ME, Byrd JA, Stern NJ, Cox NA. Detection of *Campylobacter* spp. in Ceca and Crops with and without Enrichment. *Poult Sci*. 2001;80:825-8.
25. Oyarzabal OA, Macklin KS, Barbaree JM, Miller RS. Evaluation of Agar Plates for Direct Enumeration of *Campylobacter* spp. from Poultry Carcass Rinses. *Appl Environm*. 2005;76(6):3351-4.
26. Freitas JA, Noronha GN. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59(3):813-5.
27. Carvalho AF, Silva DM, Azevedo SS, Piatti RM, Genovez ME, Scarcelli E. Detecção dos genes da toxina cotoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62(5):1054-61.
28. Cortez ALL, Carvalho ACBF, Scarcelli L, Miashiro S, Vidal-Martins AMC, Burger KP. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006;48(6):307-10.
29. Carvalho ACBF, Lima VHC, Pereira G T, Schocken-Iturrino RP. *Campylobacter* em granja avícola. *Rev Port Ciênc Vet*. 2001;96(540):191-5.
30. Scarcelli E, Miyashiro S, Campos FR. Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos pela reação da polimerase em cadeia. *Hig Alim*. 2005;19:71-6.
31. Prencipe V, Parisiani G, Calistri P. Thermotolerant *Campylobacter* in poultry meat marketed in the Abruzzo and Molise regions of Italy: prevalence and contaminations levels. *Vet Ital*. 2007;43:157-65.
32. Mead CG, Hudson WR, Hinton MH. Effects of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol Infect*. 1995;115:495-500.
33. Peyrat MB, Soumet C, Maris P, Sanders P. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(2):188-94.

## Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante

### Evaluation of the alcoholic extract of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a protective antibacterial and antioxidant component

RIALA6/1491

Mônica Jachetti MACIEL\*, Marcelo Pinto PAIM, Heloisa Helena Chaves CARVALHO, José Maria WIEST

\*Endereço para correspondência: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9.090, Caixa Postal 15.094, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: (51) 8151-8345, (51) 3308-6123. E-mail: moni.jm@hotmail.com  
Recebido: 22.12.2011 – Aceito para publicação: 12.08.2012

#### RESUMO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e pode ser utilizado como planta medicinal e alimento funcional. Este estudo determinou a intensidade de atividade de inibição (IINIB) e a inativação bacteriana (IINAB) *in vitro* de dois extratos alcoólicos, obtidos de cálices e frutos com sementes de diferentes acessos de hibisco. As análises foram efetuadas sobre as bactérias de padrão internacional, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus*, associando-se os resultados aos polifenóis totais e antocianinas. Diferenças significativas na atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos foram observadas em ambos os acessos. *Salmonella* Enteritidis (11,5) e *E. coli* (12) foram as bactérias mais sensíveis, respectivamente, aos extratos alcoólicos de cálices de hibisco e dos frutos com sementes. *S. aureus* (5,2 e 0,1) foi a mais resistente a ambos os extratos. Os valores de IINIB foram predominantemente maiores quando comparados aos de IINAB, o que indica que geralmente a atividade bacteriostática é maior do que a bactericida. Os valores de polifenóis totais e de antocianinas do extrato alcoólico de cálices apresentaram diferença significativa e foram superiores aos do extrato alcoólico dos frutos com sementes. Possivelmente exista associação direta entre a concentração de antocianina e a atividade antibacteriana em diferentes estruturas vegetais do hibisco.

**Palavras-chave.** *Hibiscus sabdariffa* L., inibição bacteriana, inativação bacteriana, antioxidantes, antocianinas.

#### ABSTRACT

The hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) has antioxidant and antimicrobial properties, it can be used as functional food and medicinal plant. This study aimed at determining the intensity of activity inhibition (IINIB) and of inactivation (IINAB) of two alcoholic extracts obtained from calyxes and fruits with seeds of different accesses of hibiscus on international standards bacterial *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus*. And the correlation between these results and the presence of total polyphenols and anthocyanins was done. The antimicrobial activity of alcoholic extract from both accesses showed a significant difference. While *Salmonella* Enteritidis (11,5) and *Escherichia coli* (12) were more susceptible to the alcoholic extract from hibiscus calyxes and fruits with seeds, respectively, the *Staphylococcus aureus* (5.2 e 0.1) was the most resistant in both extracts. The IINIB values were higher than IINAB values, showing that the bacteriostatic activity was usually higher than the bactericide. Total polyphenols and anthocyanins contents in calyxes alcoholic extract showed a significant difference, and they were higher than in alcohol extract from fruits with seeds. It seems likely that occurs a direct correlation between the anthocyanin concentration and the antibacterial activity in different structures of the hibiscus plant.

**Keywords.** *Hibiscus sabdariffa* L., bacterial inhibition, bacterial inactivation, antioxidants, anthocyanin.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido uma intensa preocupação pela disponibilidade de uma alimentação de qualidade e natural, pois os alimentos que contêm altos níveis de conservantes para redução da carga microbiana são indesejáveis. Desse modo, a pressão por parte dos consumidores se volta para uma maior produção de alimentos frescos, com conservantes naturais e maior garantia de segurança<sup>1</sup>.

Existe grande interesse em substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais nos alimentos. As substâncias naturais, de origem vegetal, tornam o alimento mais atrativo ao consumidor<sup>2</sup>, além de aumentar a vida útil pela capacidade bacteriostática e bactericida, retardando o início da deterioração e o crescimento de micro-organismos indesejáveis<sup>3</sup>. Já o uso inadequado de antibióticos sintéticos faz com que micro-organismos patogênicos apresentem resistência a medicamentos, havendo a necessidade de novos antimicrobianos de fontes naturais<sup>4</sup>. O mesmo ocorre com os antioxidantes sintéticos, restritos tanto pela aplicação quanto pela quantidade<sup>5</sup>.

Conhecido popularmente como vinagreira, rosela, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, azeda-da-guiné, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosela, rosélia, groselha, quiabo-de-angola, groselheira<sup>6</sup>, o hibisco é uma espécie vegetal da família Malvaceae, proveniente da África Oriental<sup>7</sup>, e foi introduzido no Brasil pelos escravos<sup>8</sup>.

Arbusto de ciclo anual, o hibisco pode atingir mais de 1,80 m de altura, é pouco ramificado e com a forma de taça de tonalidade vermelha<sup>9</sup>. Cultivado em regiões tropicais e subtropicais, a flor é simples, séssil e axilar. A corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone, que forma o cálice. Na base do cálice, está o cálculo ou o pequeno cálice disposto em círculo<sup>10</sup>. A cápsula deiscente é o fruto que possui aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento, abrigando as sementes<sup>11</sup>.

O hibisco é alimento funcional nos países da Ásia (Japão, China, Coreia e Taiwan)<sup>12</sup>, e o interesse econômico está nos cálices desidratados, utilizados mundialmente para a produção de bebidas, alimentos<sup>13</sup>, conservantes<sup>12</sup> e antioxidantes<sup>14</sup>. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio da Portaria nº 519, de 1998<sup>15</sup>, considera que as flores do hibisco podem ser consumidas como chá, preparadas por meio de infusão ou

decoção. Já as sementes do fruto do *Hibiscus sabdariffa* L. surgem como subproduto concomitante ao cultivo em larga escala e a exploração comercial da planta<sup>16</sup>. Essas estruturas vegetais podem ser fonte de antioxidantes. Ao serem trituradas, são utilizadas na alimentação humana como fonte expressiva de proteína e, se torradas, são substitutas do café<sup>17</sup>. Alguns autores, como Chao e Yin<sup>18</sup>, relatam uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

Um estudo realizado por Akindahunsi e Olaleye<sup>19</sup> concluiu que, em ratos, a média de consumo de 150-180 mg/kg/dia do extrato aquoso-etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mostrou-se segura. Entretanto, o consumo em altas doses pode elevar a atividade de algumas enzimas no plasma.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e de Inativação Bacteriana (IINAB) *in vitro* de dois extratos alcoólicos obtidos de cálices e frutos com sementes de diferentes acessos (Palmares do Sul [RS] e Porto Alegre [RS]) de *Hibisco sabdariffa* L. (hibisco) frente a agentes bacterianos de padrões internacionais, relacionando esses resultados à presença de polifenóis totais e antocianinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre.

Os ramos do hibisco (*Hibisco sabdariffa* L.) *in natura* foram coletados em Palmares do Sul, Bacupari (coordenadas 30°16'S e 50°28'O) e Porto Alegre, e Lami (coordenadas 30°14'S e 51°06'O). As amostras foram identificadas botanicamente e encaminhadas como exsiccatas para registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo os registros ICN 165038 (acesso Palmares do Sul) e ICN 165039 (acesso Porto Alegre).

Foram separados manualmente os cálices e os cálculos, restando os frutos com as sementes do hibisco. O termo "cálice", neste trabalho, envolve o cálice propriamente dito e o pequeno cálice ou cálculo. O termo "fruto com semente" envolve a cápsula deiscente e as sementes do hibisco. Os componentes vegetais do hibisco foram colocados, separadamente, em álcool etílico de cereais (Farmaquímica®, Porto Alegre) a 96 °GL, na

**Tabela 1.** Valores ordinais arbitrários referentes a Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinárias de intensidade de atividade
$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	n.a	UFC.mL <sup>-1</sup> – diluições de inóculo inibidas ou inativadas
$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$	10	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	n.a	UFC.mL <sup>-1</sup> – doses infectantes inibidas ou inativadas

n.a: ausência de atividade antibacteriana; UFC.mL<sup>-1</sup>: unidades formadoras de colônias por mL.

proporção de 400 g de cálices/frutos com sementes para 1.000 mL de álcool, na extração alcoólica. Após quinze dias, foram submetidos à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais dos componentes<sup>20</sup>. Para o controle da assepsia dos procedimentos de extração e reconstituição de todos os extratos, utilizou-se o caldo Cérebro e coração (BHI, Himedia®, Mumbai, Índia), confirmando a esterilidade posteriormente por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, Acumedia®, Maryland, Baltimore, EUA).

Foram utilizados quatro agentes bacterianos de padrões internacionais (ATCC– American Type Culture Collection), *Staphylococcus aureus* (25923), *Enterococcus faecalis* (19433), *Escherichia coli* (11229) e *Salmonella* Enteritidis (11076). Essas bactérias pertenciam ao Laboratório de Higiene do ICTA/UFRGS e foram ativadas para atingir concentração  $\geq 1,0 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> para confrontação com os extratos alcoólicos de cálices e frutos com sementes de hibisco, por meio de diluições seriais logarítmicas<sup>20</sup>. A avaliação da concentração inicial foi realizada por meio da técnica da microgota<sup>21</sup>, e a contagem de micro-organismos viáveis foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura BHI (Difco®). Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1 mL deste para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (Biobrás®, Montes Claros, MG) até a obtenção da diluição  $10^{-12}$ . De cada diluição foram transferidas três gotas para placas de Petri utilizando micropipetas de 15  $\mu$ L, e a leitura foi realizada em intervalos de 24, 48, 72 e 144 horas de incubação aeróbia a 37 °C. O valor final considerado foi constituído da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza<sup>22</sup>.

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de hibisco lida como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/Bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/Bactericidia (IINAB), utilizou-se o Teste de Diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft

(Sociedade Alemã de Medicina Veterinária)<sup>23</sup> com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini e Wiest<sup>20</sup>, confrontando-se os diferentes extratos com 12 diluições seriais logarítmicas ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) dos diferentes inóculos bacterianos.

Entende-se por IINIB/Bacteriostasia o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico, o BHI, e por IINAB/Bactericidia, o resultado desse confronto, porém sob a influência de desestressores/desinibidores bacterianos como Tween 80 (Reação Química®, Porto Alegre), L-histidina (Labsybt®, Diadema, SP) e lecitina de soja (Herbarium®, Colombo, PR), acrescidos ao mesmo BHI<sup>20</sup>. Os resultados são expressos em valores que são representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bactericidia de diferentes soluções antibacterianas sobre diferentes micro-organismos, em testes de sensibilidade. Os resultados de IINIB e de IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de 12 a 0, sendo que o valor de 12 (doze) representa atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, como demonstra a Tabela 1.

Para saber se existe diferença significativa entre as variáveis, aplicou-se a análise de variância – ANOVA (Microsoft Excel para Windows), seguida pelo teste de Tukey. Esse teste é um complemento à ANOVA e visa identificar quais médias, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si<sup>24</sup>. A sua utilização teve como objetivo avaliar as diferenças existentes entre os quatro inóculos (padrões bacterianos internacionais).

A extração de polifenóis totais foi realizada segundo a metodologia de Vinson et al.<sup>25</sup>, com modificações. Amostras de 100  $\mu$ L do extrato (cálices e frutos com sementes) foram colocadas em tubos tipo eppendorf, sendo acrescidos 500  $\mu$ L de solução de extração contendo metanol (Grupo Químico®, BR) a 50% e ácido clorídrico (Nuclear®, BR) a 1,2M. Os tubos foram colocados em banho-maria a 90 °C por três horas. Posteriormente, foram retirados do banho e, depois de resfriados em temperatura ambiente, o volume foi completado a 1 mL com metanol puro (Grupo Químico®, BR). Em seguida, as amostras foram centrifugadas

(Centrifuge 5415R – Eppendorf®, Alemanha) (5.000 rpm/5 minutos) e os sobrenadantes foram obtidos, sendo estes denominados extratos de polifenóis totais. As extrações foram realizadas em duplicata.

A determinação de polifenóis totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Proton Química®, RS) segundo Karou et al.<sup>26</sup>. A solução de Folin foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e água deionizada 1:1 (v/v). Em tubo tipo *eppendorf*, foram adicionados 30 µL do extrato de polifenol, acrescidos de 75 µL da solução de Folin-Ciocalteu. Após cinco minutos de reação, foram adicionados 75 µL de solução de carbonato de sódio (Synth®, BR) (20%) e o volume foi completado com água deionizada até 600 µL. A solução reagiu por 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu®, Japão) a 750 nm utilizando ácido gálico (Merck®/BR) como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato. A determinação de polifenóis totais foi realizada em quatro experimentos independentes, cada um em duplicata.

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método da diferença de pH em que se dissolve dois sistemas tampão, o cloreto de potássio (Merck®, BR) pH 1 (0,025 M) e acetato de sódio (Synth®, BR) pH 4,5 (0,4 M). Foram adicionados 1,8 mL da correspondente solução tampão a 0,2 mL da amostra diluída para se obter a densidade óptica na faixa de 540 e 700 nm (Kuskoski et al.<sup>27</sup>, com modificação).

Utilizou-se a equação para determinar a absorbância:

$$A = (A_{\text{máx.vis.}(540 \text{ nm})} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1} - (A_{\text{máx.vis.}(540 \text{ nm})} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4,5}$$

O cálculo das antocianinas foi baseado em Teixeira et al.<sup>28</sup>, modificado para:

$$\text{AntT (mg } 100.\text{g}^{-1}\text{): } [D.O. \times F.D. \times 1000X P.M.] / [Fex \times m]$$

Onde *D.O.* é a densidade ótica do extrato, *F.D.* é o fator de diluição, *P.M.* é o peso molecular, o *Fex* é o fator de extinção e o *m* é a massa de amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da sensibilidade das bactérias testadas frente à solução antimicrobiana alcoólica de cálices e frutos com sementes de hibisco, obtida de dois diferentes acessos,

independentemente do tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/desinibidores bacterianos, apresentou diferença significativa entre as bactérias confrontadas, como pode ser visto na Tabela 2. A atividade antibacteriana do extrato alcoólico de cálices do hibisco, em ambos os acessos, apresentou diferença significativa quando relacionado ao extrato alcoólico dos frutos com sementes, ou seja, o extrato alcoólico dos cálices obteve poder antibacteriano maior do que o extrato alcoólico dos frutos com sementes do hibisco. Fato que, possivelmente, pode estar relacionado à maior quantidade de antocianinas no extrato alcoólico de cálices, se comparado ao extrato alcoólico de frutos com sementes. A mesma hipótese foi constatada por Chao e Yin<sup>18</sup>, que, utilizando o extrato alcoólico e aquoso de cálices de hibisco e ácido protocatecuico contra bactérias de interesse alimentar, constataram possível relação entre os compostos fenólicos e o efeito antibacteriano dos extratos de cálices de hibisco.

Independentemente do acesso, somente considerando a estrutura vegetal, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* foram as bactérias mais sensíveis ao extrato alcoólico de cálices de hibisco e de frutos com sementes, respectivamente (Tabela 2). Nos dois extratos, *Staphylococcus aureus* expressou a maior resistência. Carvalho et al.<sup>29</sup>, ao estudarem a atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar, concluíram que a bactéria *Salmonella* Enteritidis demonstrou, predominantemente, a maior sensibilidade aos diferentes extratos.

Analisando as atividades antimicrobianas relacionadas aos acessos e às diferentes estruturas vegetais (Tabela 2) no extrato alcoólico de cálices de Palmares do Sul, a bactéria mais sensível foi *Salmonella* Enteritidis e a mais resistente, *Staphylococcus aureus*. No extrato alcoólico de frutos com sementes, o maior valor arbitrário representando a maior sensibilidade foi *Escherichia coli* e demonstrando maior resistência, *Enterococcus faecalis*. No acesso Porto Alegre, a maior sensibilidade demonstrada foi da *Salmonella* Enteritidis para ambos os extratos, porém, a maior resistência foi manifestada pela *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nos extratos alcoólicos de cálices e frutos com sementes. Diversos fatores, dentre os quais temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, micro e macronutrientes disponíveis, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos<sup>30</sup> podem estar influenciando a atividade secundária de plantas medicinais e, conseqüentemente, poderiam estar alterando os teores

**Tabela 2.** Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas frente aos extratos de dois acessos de cálices e de frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L., independentemente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/desinibidores bacterianos

Espécie bacteriana	Valores Arbitrários*		Valor p
	Cálices	Frutos com sementes	
<b>Acesso Palmares do Sul/RS</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	10,4 <sup>b</sup>	3,3 <sup>a</sup>	p < 0,05
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	10 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076)	11,5 <sup>a</sup>	4,7 <sup>c</sup>	p < 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	7,8 <sup>c</sup>	9,7 <sup>d</sup>	p < 0,05
<b>Acesso Porto Alegre/RS</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	8,3 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>	p < 0,05
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	7,7 <sup>c</sup>	0,4 <sup>a</sup>	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076)	11,5 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup>	p < 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	5,2 <sup>d</sup>	0,1 <sup>c</sup>	p < 0,05

\*12 a 1 = valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 2 repetições); 0 = não atividade.

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p < 0,05). Valor p < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando-se espécies bacterianas e acessos.

**Tabela 3.** Análise da presença e da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de cálices de dois acessos de *Hibiscus sabdariffa* L., independentemente dos fatores tempo de confrontação, considerando-se espécies bacterianas

Espécie bacteriana	Palmares do Sul/RS			Porto Alegre/RS		
	IINIB*	IINAB*	Valor p	IINIB*	IINAB*	Valor p
<i>Enterococcus faecalis</i>	11,6 <sup>b</sup>	9,1 <sup>b</sup>	p < 0,05	9,3 <sup>b</sup>	7,3 <sup>b</sup>	p < 0,05
<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	p > 0,05	8,5 <sup>a</sup>	6,9 <sup>c</sup>	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis	12 <sup>c</sup>	11 <sup>c</sup>	p < 0,05	11,8 <sup>c</sup>	11,3 <sup>a</sup>	p > 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 <sup>b</sup>	4,5 <sup>b</sup>	p < 0,05	9,4 <sup>b</sup>	1 <sup>d</sup>	p < 0,05

\*12 a 1 = valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 2 repetições); 0 = não atividade.

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p < 0,05). Valor p < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando-se espécies bacterianas e acessos.

do composto relacionado à atividade antimicrobiana dos diferentes acessos de hibisco.

Os tratamentos IINIB e IINAB do extrato alcoólico de cálices de hibisco em relação à espécie bacteriana confrontada, independentemente do fator tempo de confrontação, apresentaram diferenças significativas (Tabela 3). O tratamento IINIB apresentou resultado superior ao IINAB para todas as espécies bacterianas, com exceção da bactéria *Escherichia coli* do acesso Palmares do Sul, que apresentou o mesmo valor para IINIB e para IINAB. A ação do extrato alcoólico de cálices de hibisco tem ação bacteriostática superior, quase que total, à ação bactericida. Com a mesma metodologia, mas com plantas diferentes, Carvalho et al.<sup>29</sup> também encontraram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.

Os maiores valores arbitrários de IINIB e IINAB, tanto para o acesso Palmares do Sul quanto para o acesso Porto Alegre, foram os valores da bactéria *Salmonella* Enteritidis (Tabela 3). Os menores valores de IINIB,

para ambos os acessos, foi de *Escherichia coli*. E, em relação à IINAB, em ambos os acessos, Palmares do Sul e Porto Alegre apresentaram os menores valores frente a *Staphylococcus aureus*.

Olaley<sup>31</sup> testou o extrato alcoólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. como um agente antibacteriano frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marsecences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescence*. O extrato obteve excelente atividade antibacteriana frente aos micro-organismos testados. A atividade antibacteriana do hibisco pode ser comparada à da Estreptomina, mas a Estreptomina não inibe *E. coli*. Porém, nesta pesquisa, o extrato alcoólico de cálices do hibisco sem os desinibidores apresentou valores arbitrários maiores tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Escherichia coli*, nos acessos Palmares do Sul e Porto Alegre, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 4.** Análise da presença e da ausência de desestressores/desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de frutos com sementes de dois acessos de *Hibiscus sabdariffa* L., independentemente dos fatores tempo de confrontação, considerando-se espécies bacterianas

Espécie bacteriana	Palmares do Sul/RS			Porto Alegre/RS		
	IINIB*	IINAB*	Valor p	IINIB*	IINAB*	Valor p
<i>Enterococcus faecalis</i>	6,5 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	p < 0,05	0,3 <sup>ad</sup>	0,3 <sup>ad</sup>	p > 0,05
<i>Escherichia coli</i>	12 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	p > 0,05	0,3 <sup>bd</sup>	0,50 <sup>bd</sup>	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis	5,4 <sup>c</sup>	4 <sup>c</sup>	p > 0,05	1,8 <sup>c</sup>	2,5 <sup>c</sup>	p < 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,5 <sup>d</sup>	7,8 <sup>d</sup>	p < 0,05	0,3 <sup>ab</sup>	0 <sup>ab</sup>	p > 0,05

\*12 a 1 = valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 2 repetições); 0 = não atividade.

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p < 0,05). Valor p < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando-se espécies bacterianas e acessos.

Na Tabela 4, estão dispostos os dados referentes à presença e a ausência de desinibidores/desestressores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de frutos com sementes dos dois acessos de hibisco, independentemente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas. Predominantemente os valores de IINIB foram maiores se relacionados aos valores de IINAB. Sendo assim, em grande parte dos experimentos os extratos vegetais apresentaram uma atividade bacteriostática maior do que bactericida. Entretanto, no acesso Palmares do Sul, o valor de IINIB e IINAB de *Escherichia coli* foi igual, e o mesmo ocorreu no acesso Porto Alegre com o valor de *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis no acesso Porto Alegre tiveram valores de IINIB menores que IINAB, ou seja, o extrato alcoólico dos frutos com sementes, nesses casos, teve uma atividade bactericida maior do que bacteriostática.

Os valores arbitrários de IINIB e IINAB do acesso Palmares do Sul mostraram-se maiores aos do acesso Porto Alegre, fato que possivelmente pode ser atribuído às diferenças locais de clima, de solo, disponibilidade de fitonutrientes e varietal, influenciando a quantidade da substância responsável pela atividade antibacteriana. Os maiores valores de IINIB e IINAB para o acesso Palmares do Sul foram da espécie bacteriana *Escherichia coli* e, para o acesso Porto Alegre, *Salmonella* Enteritidis. Os valores de IINAB de *Enterococcus faecalis* (acesso Palmares do Sul) e *Staphylococcus aureus* (Porto Alegre) foram zero, considerando que somente houve bacteriostasia e não bactericida (Tabela 4).

Muitos trabalhos têm sido realizados envolvendo a atividade antimicrobiana de plantas, mais especificamente aquelas plantas utilizadas para fins medicinais<sup>20,29</sup>. Em se tratando de cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), diversas publicações mostram

que essa planta possui compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de micro-organismos<sup>18,31</sup>. Porém, existem poucos estudos como este mostrando a atividade antimicrobiana de outros componentes vegetais do hibisco.

A quantidade de polifenóis totais e antocianinas do extrato alcoólico de cálices e do extrato alcoólico dos frutos com sementes apresentaram diferença significativa. O extrato alcoólico de cálices apresentou maior quantidade de antocianinas do que o extrato alcoólico de frutos com sementes, como pode ser observado na Tabela 5. Um estudo realizado por Juliani et al.<sup>32</sup> avaliou a atividade antioxidante, os fenóis totais e o conteúdo de antocianina com extrato metanólico de cálices de diferentes colorações de *Hibiscus sabdariffa* L. e constatou que a relação entre a cor dos cálices e a quantidade de antocianina não está sempre em conformidade. Entretanto, neste estudo ocorreu o contrário, onde os frutos com sementes, de coloração verde, apresentaram menor quantidade de polifenóis totais e de antocianinas quando comparados aos cálices vermelhos. A alta concentração de antocianinas e de polifenóis totais nos extratos alcoólicos do hibisco também foi referenciada por outros autores<sup>33</sup>, quando relacionaram a alta concentração de antocianinas nos cálices do hibisco com uma boa fonte de antioxidantes, devido à presença de compostos fenólicos.

Em diversas pesquisas, os fenóis e as antocianinas foram extraídos do cálice do hibisco utilizando água<sup>34</sup> e metanol<sup>35</sup>, e poucos estudos como este foram realizados utilizando o etanol como solvente<sup>36</sup>. As extrações dos compostos antimicrobianos e antioxidantes (antocianinas e polifenóis totais) nas diferentes estruturas do hibisco, neste trabalho, foram realizadas por meio de alcoolatura etanólica. Mohd-Esa et al.<sup>37</sup> testaram a atividade antioxidante em diferentes partes do hibisco, comparando

**Tabela 5.** Teor de polifenóis e antocianinas das diferentes estruturas de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) confrontado com a atividade antibacteriana exercida pelas diferentes estruturas de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independentemente dos fatores tempo de confrontação, acesso e espécie bacteriana de interesse alimentar e da presença ou da ausência de desestressores/desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de *Hibiscus sabdariffa* L

Estrutura vegetal	Polifenóis totais (mg GAE.100 g <sup>-1</sup> )	Antocianinas (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Valor p	Atividade antibacteriana*
Cálices	162,1	85,9	p < 0,05	9,1
Frutos com sementes	114,9	3,2	p < 0,05	4,1

\*12 a 1 = valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 4 repetições); 0 = não atividade.

o extrato metanólico com o aquoso e constatando que o extrato alcoólico, embora metanólico, ofereceu determinação mais realista da atividade antioxidante do que o extrato obtido por meio de água destilada. Nessa mesma pesquisa<sup>37</sup>, as sementes tiveram um conteúdo de fenóis maior do que qualquer outra estrutura vegetal do hibisco, tanto na extração feita por metanol quanto por água. Esses dados não estão de acordo com o encontrado neste experimento, onde o extrato alcoólico de cálices apresentou uma quantidade maior de polifenóis totais quando comparado ao extrato de frutos com sementes.

Ramos et al.<sup>38</sup> avaliaram os fenóis em duas formas de preparo do cálice do hibisco, extrato aquoso e etanólico, e constataram que os valores obtidos foram similares, mostrando que ambos são fonte desses constituintes. A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos depende da estrutura química e da concentração desses fitoconstituintes, que, por sua vez, é amplamente influenciado por fatores genéticos, adubação e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta. A nutrição das plantas é afetada diretamente pela composição do substrato utilizado, pelos níveis de nutrientes disponíveis e conforme a quantidade de adubo adicionado<sup>38</sup>.

Muitos estudos têm demonstrado que os flavonoides e os compostos polifenólicos extraídos do vinho tinto, do suco de uva e dos chás podem prevenir a aterosclerose em *hamsters*<sup>39</sup>. Logo, o extrato alcoólico de cálices do hibisco poderia ser utilizado como uma substância alternativa atuando na prevenção de algumas doenças, já que possui uma expressiva quantidade de polifenóis totais.

Em relação ao rendimento médio do acesso Palmares do Sul, para o extrato alcoólico de cálices e extrato alcoólico de frutos com sementes, foi de 32%; já para o acesso Porto Alegre, 27,7% e 30,5% para o extrato alcoólico de cálices e frutos com sementes, respectivamente. O método de extração foi considerado relativamente bom, uma vez que Fiuza et al.<sup>40</sup>, utilizando

o mesmo método de extração, obtiveram rendimento de 25,78% no extrato de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

Analisando a Tabela 5, a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de cálices é maior do que a do extrato alcoólico dos frutos com sementes, permitindo concluir que, possivelmente, as antocianinas, nas condições deste experimento, seriam as responsáveis por essa atividade. Esses resultados confirmam a hipótese inicial de que a relação entre o teor de antocianinas é diretamente proporcional à atividade antibacteriana.

## CONCLUSÃO

Constatou-se que nos dois extratos, quanto às espécies bacterianas, ocorreu uma maior atividade bacteriostática do que bactericida, ou seja, os valores de IINIB foram superiores aos de IINAB. Predominantemente, a bactéria mais sensível foi *Salmonella* Enteritidis. Quanto à atividade antibacteriana dos diferentes acessos, os valores arbitrários dos extratos alcoólicos de cálices e de frutos com sementes do hibisco de Palmares do Sul foram superiores quando comparados aos de Porto Alegre.

A atividade antibacteriana, a quantidade de polifenóis totais e de antocianinas do extrato alcoólico de cálices do hibisco apresentaram valores maiores do que o extrato alcoólico de frutos com sementes. Sendo assim, possivelmente existe uma relação direta entre essas variáveis em diferentes estruturas vegetais do hibisco.

## AGRADECIMENTO

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento continuados. À Capes, pela bolsa de estudos de pós-graduação.

## REFERÊNCIAS

1. Forsythe, SJ. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002. 424 p.
2. Pereira MC, Vilela GR, Costa LMAS, Silva RF, Fernandes AF, Fonseca EWN, et al. Inibição do desenvolvimento fúngico



- através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(4):731-8.
3. Souza EL, Lima EO, Narain N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. *Hig Aliment*. 2003;17(113):38-42.
  4. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte, MCT, Rehder VLG, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004;35:275-80.
  5. Peng Y, Yuan J, Liu F, Ye J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;39(3-4):431-7.
  6. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. São Paulo (SP): Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.
  7. Martins ER, Castro DM, Castellano DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1994.
  8. Panizza S. Plantas que curam: cheiro de mato. 2. ed. São Paulo (SP): IBRASA; 1997.
  9. McCaleb RS. Roselle Production Manual (*Hibiscus sabdariffa*). Herb Research Foundation, USA, 1998. [acesso 2009 dez 20]. Disponível em: [http://www.herbs.org/afrika/hibiscus production manual.html].
  10. Castro NEA, Pinto JEBP, Cardoso MG, Morais AR, Bertolucci SKV, Silva FG, et al. Planting time for maximization of yield of vinegar plant calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Ciênc Agrotec*. 2004;28(3):542-51.
  11. Mahadevan N, Shivali, Pradeep K. *Hibiscus sabdariffa* Linn. An overview. *Nat Prod Radiance*. 2009;8(1):77-83.
  12. Liu KS, Tsao SM, Yin MC. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother Res*. 2005; 19:942-5.
  13. D'Heurex-Calix F, Badrie N. Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces. *Food Serv Technol*. 2004;4:141-8.
  14. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(5):411-16.
  15. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de "Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções". Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 29 jun 1998.
  16. Vilche C, Gely M, Santalla E. Physical properties of quinoa seeds. *Biosyst Eng*. 2003;86(1):59-65.
  17. Morton JF. Roselle. In: Morton JF. Fruits of warm climates. Miami, FL: Florida Fair Books, 1987, p. 281-6.
  18. Chao CY, Yin MC. Antibacterial effects of Roselle Calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborn Pathog Dis*. 2009;6(2):201-6.
  19. Akindahunsi AA, Olaleye MT. Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *J Ethnopharmacol*. 2003;89:161-4.
  20. Avancini CAM, Wiest JM. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. *Eshclecht*. Guttiferae ("escadinha/sinapismo") frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). *Rev Bras Plantas Med*. 2008;10(1):64-9.
  21. Romeiro RS. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. [acesso 2009 abr 05]. Disponível em: [http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf].
  22. Cavalli-Sforza L. Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica). Stuttgart: Gustav Fisher, 1974. p. 201-4.
  23. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária. Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin/ Normas para a testagem de desinfetantes químicos para a medicina veterinária. Giessen, 1980. In: Schliesser Th, Strauch D. Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft/ Desinfecção na produção animal, em laticínios e em frigoríficos. Stuttgart: Enke Verlag, 1981.
  24. Callegari-Jacques SM. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre (RS): Artmed; 2003.
  25. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5315-21.
  26. Karou D, Dicko MH, Simporé J, Traore AS. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr J Biotechnol*. 2005;4(8):823-8.
  27. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutas Tropicais Silvestres e Polpas de Frutas Congeladas: Atividade Antioxidante, Polifenóis e Antocianinas. *Ciênc Rural*. 2006;36(4):1283-7.
  28. Teixeira L, Stringheta PC, Oliveira FA. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Rev Ceres*. 2008;4(55):297-304.
  29. Carvalho HHC, Cruz FT, Wiest JM. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. *Rev Bras Plantas Med*. 2005;7(3):25-32.
  30. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*. 2007;30(2):374-81.
  31. Olaleye MT. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J Med Plant Res*. 2007;1(1):9-13.
  32. Juliani HR, Welch CR, Wu Q, Diouf B, Malainy D, Simon JE. Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *J Food Sci*. 2009;74(2):113-21.
  33. Sáyago-Ayerdi SG, Arranz S, Serrano J, Goñi I. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J Agric Food Chem*. 2007;55(19):7886-90.
  34. Tsai PJ, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Res Int*. 2002;35:351-6.
  35. Fullerton M, Khatiwada J, Johnson JU, Davis S, Williams LL. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Esherichia coli* O157:H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. *J Med Food*. 2011;14(9):950-6.
  36. Yang L, Gou Y, Zhao T, Zhao J, Li F, Zhang B, et al. Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Afr J Biotechnol*. 2012;11(17): 4063-8.

37. Mohd-Esa N, Hern FS, Ismail A, Yee CL. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chem*. 2010;122:1055-60.
38. Ramos DD, Vieira MC, Formagio ASN, Cardoso CAL, Ramos DD, Carnevali TO. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. *Ciênc Rural*. 2011;41(1):1331-6.
39. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 2001;156:67-72.
40. Fiuza TS, Silva PC, Paula JR, Tresvezol LMF, Souto MED, Sabóia-Morais SMT. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) – Myrtaceae. *Rev Bras Planta Med*. 2011;13(4):389-95.

## Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda)

Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (eucalyptus) and *Lavandula angustifolia* (lavender)

RIALA6/1492

Sheila Mello da SILVEIRA<sup>1,2</sup>, Anildo CUNHA Jr.<sup>3</sup>, Gerson Neudí SCHEUERMANN<sup>3</sup>, Fábio Luiz SECCHI<sup>2</sup>, Silvani VERRUCK<sup>2</sup>, Marisete KROHN<sup>2</sup>, Cleide Rosana Werneck VIEIRA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Av. Admar Gonzaga, 1.346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: +55 (48) 3721-5380/5378. Fax: +55 (48) 3334-6086. E-mail: cleiderosana@cca.ufsc.br

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Concórdia, SC, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Análises Físico-Químicas (LAFQ), Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – Fapesc (Edital 8/2009, processo FCTP 3302/091)

Recebido: 25.10.2011 – Aceito para publicação: 03.06.2012

### RESUMO

Neste estudo, foi determinada a composição química de óleos essenciais obtidos de três espécies de plantas medicinais cultivadas na região Sul do Brasil: *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda), e as atividades antimicrobianas foram avaliadas frente a 11 espécies de bactérias, incluindo-se espécies de importância em alimentos e em saúde pública. A composição dos óleos essenciais, obtidos por destilação a vapor, foi determinada por CG/DIC e CG/EM; a atividade antimicrobiana foi detectada pela técnica de difusão em disco; a CMI e a CMB foram determinadas pela metodologia de microdiluição. Os óleos essenciais de lavanda e citronela apresentaram monoterpenos oxigenados como componentes majoritários e, no óleo essencial de eucalipto, os monoterpenos hidrocarbonados foram os principais constituintes. O óleo essencial de citronela foi o mais ativo contra a maioria das bactérias testadas, com valores de CMI e CMB, respectivamente, de 0,075 e 0,31 mg/mL para *Yersinia enterocolitica*. O óleo essencial de lavanda destacou-se pela atividade inibitória contra *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium, e o óleo de eucalipto foi ativo contra *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo demonstra que os óleos essenciais avaliados apresentam potencial para aplicação como agentes antimicrobianos naturais.

**Palavras-chave.** óleos voláteis, antimicrobianos, produtos naturais, plantas medicinais.

### ABSTRACT

The chemical composition of essential oils derived from three medicinal plant species growing in the South of Brazil: *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (eucalyptus), and *Lavandula angustifolia* (lavender) was determined, and their antimicrobial activities were evaluated against 11 bacterial species, including those related to foodborne and human pathogens. The essential oils were obtained by steam distillation, and its chemical composition was analyzed by GC and GC/MS. Antimicrobial activity was screened by disc-diffusion assay. MIC and MBC of the sensitive strains were determined by microdilution methodology. The main components of lavender and citronella essential oils were the oxygenated monoterpenes, and the monoterpene hydrocarbons in eucalyptus oil. Citronella oil showed the lowest MIC and MBC values on the majority of the tested bacteria, and the MIC and MBC values against *Yersinia enterocolitica* were of 0.075 and 0.31 mg/mL, respectively. The lavender oil was active against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium, and the eucalyptus inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. This study showed that the evaluated essential oils might be potentially used as natural antimicrobial agents.

**Keywords.** volatile oils, antimicrobials, natural products, medicinal plants.

## INTRODUÇÃO

A vida vegetal tem sido, ao longo das eras de evolução, alimento e remédio para toda a sorte de espécies animais, das mais primitivas às mais especializadas. A busca e o uso de plantas com propriedades bioativas é uma prática multimilenar, atestada em vários tratados de fitoterapia das grandes civilizações há muito desaparecidas<sup>1,2</sup>. Atualmente, com a emergência de linhagens de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, observa-se uma renovação no interesse pela busca de agentes antimicrobianos alternativos<sup>3</sup>. Além disso, o consumidor tem valorizado cada vez mais a disponibilização de produtos cosméticos e alimentícios mais naturais, saudáveis e que possam trazer algum benefício à saúde. Esses fatores têm contribuído para aumentar o interesse na pesquisa de produtos naturais que apresentem atividades biológicas tais como a atividade antimicrobiana<sup>4,5</sup>.

Óleos essenciais são produtos aromáticos e voláteis derivados do metabolismo secundário de plantas, formados em células e grupos de células especiais, e normalmente encontram-se concentrados em uma determinada região, tal como folhas, frutos ou casca<sup>6</sup>.

Encontram-se, na literatura, várias publicações a respeito da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais<sup>3-5</sup>. Entretanto, frequentemente verificam-se diferenças significativas na atividade antimicrobiana reportada para uma mesma espécie vegetal. Essas diferenças devem-se, principalmente, às diferentes localizações geográficas, época de coleta, genótipo e condições climáticas<sup>7</sup>, sendo, portanto, necessária a caracterização da composição química e da atividade biológica de óleos essenciais obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 140 espécies e é amplamente distribuído nas regiões de climas semitemperado a tropical em todo o mundo. Duas espécies principais de citronela são conhecidas e têm importância industrial na área farmacêutica, cosmética e de perfumaria: *C. nardus* (citronela do Ceilão) e *C. winterianus* (citronela de Java)<sup>8</sup>. Dentre suas atividades biológicas, destacam-se a ação repelente de insetos<sup>9</sup>, apresentando atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*<sup>10</sup> e a atividade antimicrobiana<sup>11,12</sup>.

As plantas do gênero *Lavandula*, pertencentes à família *Lamiaceae*, têm sido utilizadas para uma variedade de propósitos cosméticos e terapêuticos. As

principais espécies de uso medicinal são *L. angustifolia* (*L. officinalis*), *L. stoechas*, *L. latifolia* e *L. x intermedia*, sendo esta última um cruzamento estéril entre *L. latifolia* e *L. angustifolia*. O óleo essencial de lavanda é bastante utilizado na aromaterapia, com efeitos neurológicos benéficos no alívio dos sintomas de estresse e depressão. Também são relatados efeitos antiespasmódico, analgésico, pesticida e antimicrobiano<sup>13</sup>, com atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes (MRSA)<sup>14</sup> e atividade antifúngica<sup>15</sup>. Os constituintes do óleo essencial de uma mesma espécie de lavanda podem variar consideravelmente dependendo da cultivar e do método de extração, e essa variação poderá determinar o valor de mercado e as possíveis aplicações do produto<sup>13</sup>. Diferenças na composição química tornam alguns óleos essenciais mais efetivos contra determinadas espécies de bactérias, direcionando seu uso terapêutico<sup>16</sup>.

Diversas espécies do gênero *Eucalyptus* vêm sendo cultivadas em larga escala em várias partes do mundo. No Brasil, esse gênero é encontrado em todas as regiões, sendo conhecidas cerca de 400 espécies, das quais são utilizados desde o caule, para a extração da celulose, até as folhas, que armazenam óleos essenciais de diferentes composições químicas<sup>17</sup>. Extratos obtidos a partir das folhas de eucalipto são aprovados para o uso como aditivos alimentares, sendo também de uso corrente em formulações cosméticas<sup>18</sup>. Espécies de eucalipto também são utilizadas na medicina popular como antisséptico e contra infecções do trato respiratório superior, em gripes, resfriados e congestão nasal<sup>19</sup>. Encontra-se, na literatura, várias publicações relativas à atividade antimicrobiana de espécies de eucalipto<sup>17,18,20</sup>, entretanto, não encontramos dados acerca dessa atividade para a espécie *Eucalyptus paniculata* Smith (*Myrtaceae*), tema do presente estudo.

Considerando o amplo potencial de aplicação dos óleos essenciais provenientes das espécies mencionadas, bem como o fato de que uma espécie vegetal pode apresentar composição química – e, portanto, também atividade biológica – variável conforme a localização geográfica, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química de óleos essenciais obtidos de três espécies de plantas medicinais cultivadas na região Sul do Brasil: *Cymbopogon winterianus* (DC) Stapf. (*Poaceae*) (citronela), *Eucalyptus paniculata* Sm. (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* Mill. (*Lamiaceae*) (lavanda), e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a 11 espécies de bactérias, dentre elas espécies de importância em alimentos e em saúde pública.

**Tabela 1.** Espécies vegetais, número de registro e partes utilizadas na obtenção dos óleos essenciais

Nome comum	Nome científico	Registro <sup>a</sup>	Data de coleta	Parte destilada
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> (DC) Stapf.	HVAT 2605	17/02/2010	Folhas
Eucalipto	<i>Eucalyptus paniculata</i> Sm.	HVAT 2599	15/03/2010	Folhas
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	HVAT 2601	29/10/2009	Folhas e sumidades floridas

<sup>a</sup>Fonte: Herbário do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES (HVAT, Lajeado, RS).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

O material vegetal foi coletado na cidade de Concórdia (SC) (27° 14' 02" S 52° 01' 40" O), no período de novembro de 2009 a março de 2010. A identificação botânica das espécies foi realizada pelo Dr. A. Jasper (Univates, RS, Brasil), e as exsiccatas (Tabela 1) foram depositadas no Herbário do Museu de Ciências Naturais do Departamento de Botânica e Paleobotânica (Univates).

### Óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos a partir das partes aéreas das plantas pelo processo de destilação a vapor, usando-se um destilador em escala-piloto fabricado em aço inoxidável. Inicialmente, cerca de 5 kg do material vegetal fresco foram acondicionados no sistema de extração. Então, o vapor foi gerado e conduzido por meio do material vegetal para liberação do conteúdo aromático. Ao final, o vapor foi condensado, para render o hidrolato e o respectivo óleo essencial. O processo foi acompanhado por 2 horas. O conteúdo condensado foi reunido e transferido para funil de separação, onde o óleo essencial foi prontamente obtido pela separação espontânea das fases. A fase superior foi coletada em tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos a 5 °C. O óleo essencial obtido como um líquido límpido foi transferido para frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

### Análise por cromatografia gasosa (CG/DIC)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Varian CP 3800 (Walnut Creek, CA, USA) equipado com injetor *split/splitless* e um amostrador automático Varian CP 8100 autoinjector. Nas separações cromatográficas utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, IL, USA) com 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme e fase estacionária composta por poli (5% difenil 95% dimetil) siloxano. Programa de temperatura do forno: 50 °C (2

min.); 220 °C (2 °C/min); 220 °C (3 min.). Temperatura do injetor: 240 °C. Temperatura do detector (DIC): 240 °C. Gás de arraste: N<sub>2</sub>, fluxo de 1,2 mL/min. As amostras foram previamente dissolvidas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:100 v/v) e 1 µL da solução resultante foi injetado no modo *split* (1:10). Os dados foram adquiridos usando-se o *software* Star Chromatography Workstation (Varian). As amostras de óleos essenciais foram analisadas em triplicata. A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos obtidas por integração eletrônica do cromatograma.

### Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu GCMS-QP2010) utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, IL, USA) com 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme e fase estacionária composta por poli (5% difenil 95% dimetil) siloxano. O programa de temperatura foi o mesmo descrito na seção anterior, e o gás de arraste utilizado foi o Hélio, a um fluxo de 1,2 mL/min. Parâmetros de operação do EM: temperatura da interface: 220 °C; modo de ionização por impacto eletrônico a 70 eV; faixa de massa: 35-350 *m/z* (0,5 scan/s). As amostras foram previamente dissolvidas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:100 v/v) e 1 µL da solução resultante foi injetado no modo *split* (1:10). Os componentes individuais foram identificados inicialmente por comparação dos respectivos espectros de massas com aqueles disponíveis na base de dados NIST 05 e por comparação dos índices de retenção (IR) relativos uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> com valores descritos na literatura<sup>21</sup>.

### Atividade antimicrobiana

#### *Culturas bacterianas*

Os óleos essenciais foram testados frente a 11 espécies de bactérias, sendo 5 espécies Gram-positivas e 6 espécies Gram-negativas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC

11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

As cepas foram mantidas a -20 °C nos meios de cultura apropriados adicionados de 10% de glicerol, e repicadas a cada 15 dias para tubos inclinados de ágar triptose de soja (TSA), mantidos a 4 °C.

#### *Deteção da atividade antimicrobiana – ensaio de disco-difusão*

A deteção de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre as bactérias testadas foi realizada por meio do método de disco-difusão<sup>22</sup>, com adaptações. As culturas em TSA foram repicadas para ágar sangue e incubadas a 35 °C por 12-18 horas, para verificação da morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir dessas placas, tomou-se 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35 °C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625 nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/mL, em solução salina, e essa suspensão foi utilizada para inocular placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, utilizando-se *swab* estéril.

Discos de papel filtro estéreis (9 mm de diâmetro e 250 g/m<sup>2</sup>) foram impregnados com 25 µL de óleo essencial puro e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a 36 °C por 18-24 horas. Discos comerciais de ampicilina (10 µg/disco) e cloranfenicol (30 µg/disco) foram utilizados como antibióticos de referência.

O diâmetro da zona de inibição foi medido, em milímetros, e a inibição foi classificada em forte, moderada ou fraca conforme Carovic-Stanko et al.<sup>23</sup>, adaptando-se os valores ao diâmetro dos discos utilizados. O ensaio foi realizado em quadruplicata e o valor apresentado como a média (± desvio padrão).

#### *Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)*

Os óleos essenciais foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração

Mínima Bactericida (CMB) para as espécies bacterianas que se mostraram sensíveis no teste de disco-difusão. A CMI foi determinada por meio do método de microdiluição<sup>24</sup>, com modificações. O inóculo foi preparado conforme descrito no item anterior.

Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100 mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100 µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). A pureza das suspensões de inóculo foi verificada por meio da inoculação simultânea em ágar não seletivo. As placas foram incubadas a 36 °C por 18 horas, e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento microbiano<sup>25</sup>.

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10 µL) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas, e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada óleo essencial que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

#### **Análise estatística**

Os dados referentes à avaliação da atividade antimicrobiana (teste de difusão em disco) foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ) para cada espécie de bactéria, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa Statistica-Statsoft® 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a composição dos óleos essenciais avaliados, determinada por cromatografia gasosa (CG -DIC e CG/EM). Neste estudo, foi possível identificar 61 compostos, que representaram de 94,87 a 97,49% da composição dos óleos voláteis. A Tabela 3 apresenta a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, avaliada por meio do teste de difusão em

disco. Os três óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana, contra diferentes espécies de bactérias e em diferentes intensidades. A CMI e a CMB foram determinadas para as espécies bacterianas que se mostraram sensíveis no teste de difusão em disco. Conforme pode ser observado na Tabela 4, os valores de CMI situaram-se entre 0,075 e >10 mg/mL e os de CMB, entre 0,31 e >10 mg/mL.

**Tabela 2.** Composição química dos óleos essenciais avaliados

Composto <sup>a</sup>	RIE <sup>b</sup>	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
α-Tujeno	924	-	-	0,27
α-Pineno	930	-	55,47	3,24
Canfeno	944	-	0,54	0,91
Sabineno	970	-	-	0,39
α-Pineno	972	-	-	5,04
1-Octen-3-ol	981	-	-	0,31
α-Mirceno	991	-	-	0,80
α-Felandreno	1004	-	0,24	-
o-Cimeno	1022	-	11,78	0,49
(+)-Silvestreno	1026	-	-	2,39
D-Limoneno	1026	2,89	2,08	-
1,8-Cineol	1028	-	5,61	46,78
α-Terpineno	1056	-	15,84	0,13
Fenchona	1086	-	-	7,94
Linalol	1102	0,66	0,18	3,03
Fenchol	1113	-	0,28	2,78
<i>trans</i> -Pinocarveol	1137	-	-	0,99
Cânfora	1141	-	-	13,71
Isopulegol	1144	0,29	-	-
<i>trans</i> -Verbenol	1145	-	-	0,17
Citronelal	1154	41,80	-	-
Pinocarvona	1160	-	-	0,51
Borneol	1165	-	0,52	0,53
Terpinen-4-ol	1176	-	0,35	0,38
Criptona	1186	-	-	0,38
α-Terpineol	1191	-	0,75	0,87
Mirtenal	1194	-	-	0,74
Mirtenol	1197	-	-	0,38
Verbenona	1209	-	-	0,15
α-Citronelol	1233	10,44	-	-
<i>cis</i> -Carveol	1221	-	0,14	-
Neral	1242	0,65	-	-
Carvona	1244	-	-	0,23
Geraniol	1259	19,63	-	-
Geranial	1273	0,75	-	-
Acetato de citronelila	1356	2,64	-	-
Acetato de α-Terpinila	1249	-	0,17	-
Eugenol	1359	0,80	-	-
Acetato de geranila	1387	5,50	-	-
α-Cariofileno	1413	-	0,15	0,20

**Tabela 2.** Composição química dos óleos essenciais avaliados (continuação)

Composto <sup>a</sup>	RIE <sup>b</sup>	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
Aromadendreno	1433	-	0,28	-
α-Bergamoteno	1433	-	-	0,23
α-(E)-Farneseno	1457	-	-	0,16
Germacreno D	1476	1,25	-	-
α-Selineno	1480	-	-	0,57
α-Elemeno	1492	-	-	0,13
α-Muroleno	1499	0,92	-	-
α-Bisaboleno	1507	-	-	0,27
α-Cadineno	1520	0,82	-	-
α-Elemol	1548	2,48	-	-
Germacreno D-4-ol	1572	2,79	-	-
Spatulenol	1574	-	0,19	-
Óxido de cariofileno	1577	-	-	0,59
Globulol	1587	-	0,12	-
Veridiflorol	1587	-	0,18	-
τ-Murolol	1639	0,87	-	-
β-Eudesmol	1646	0,34	-	0,18
Óxido de α-Bisabolol A	1651	-	-	0,17
α-Cadinol	1652	1,29	-	-
α-Bisabolol	1683	-	-	1,45
(E,E)-Farnesol	1724	0,21	-	-
Total identificado (%)		97,02	94,87	97,49
Monoterpenos hidrocarbonados		2,89	85,95	13,66
Monoterpenos oxigenados		82,36	8,00	79,57
Sesquiterpenos hidrocarbonados		2,99	0,43	1,56
Sesquiterpenos oxigenados		7,98	0,49	2,39
Rendimento (% p/p material fresco)		0,48	0,25	0,19
Matéria seca (%)		24,72	31,42	26,40

<sup>a</sup>Os compostos estão listados em ordem de eluição da coluna Rtx-5MS

<sup>b</sup>Índice de retenção determinado experimentalmente na coluna Rtx-5MS utilizando-se uma série homóloga de alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia*, detectada através do teste de difusão em disco (mm)<sup>a</sup>

	Citronela ( <i>C. winterianus</i> )	Eucalipto ( <i>E. paniculata</i> )	Lavanda ( <i>L. angustifolia</i> )	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	33,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	22,9 ± 0,5 <sup>c</sup>	21,6 ± 1,4 <sup>c</sup>	36,4 ± 1,8 <sup>a</sup>	26,1 ± 0,5 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i>	17,7 ± 0,6 <sup>c</sup>	16,0 ± 0,6 <sup>d</sup>	15,6 ± 0,7 <sup>d</sup>	27,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	23,6 ± 0,2 <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	28,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	21,5 ± 1,3 <sup>c</sup>	13,2 ± 0,5 <sup>d</sup>	31,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	28,4 ± 1,0 <sup>b</sup>
<i>B. cereus</i>	50,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	22,4 ± 1,2 <sup>c</sup>	14,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	12,1 ± 0,2 <sup>d</sup>	27,9 ± 0,7 <sup>b</sup>
<i>B. subtilis</i>	85,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	22,5 ± 1,1 <sup>c</sup>	15,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	31,1 ± 1,8 <sup>b</sup>	29,9 ± 0,5 <sup>b</sup>
<i>Y. enterocolitica</i>	13,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	14,0 ± 0,4 <sup>d</sup>	19,6 ± 1,3 <sup>c</sup>	21,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	28,1 ± 0,5 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	15,5 ± 0,8 <sup>c</sup>	18,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	26,1 ± 0,6 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	11,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	27,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	24,4 ± 0,5 <sup>b</sup>
<i>E. aerogenes</i>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	12,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	23,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
<i>P. vulgaris</i>	18,5 ± 0,6 <sup>c</sup>	19,6 ± 0,5 <sup>bc</sup>	19,5 ± 1,0 <sup>bc</sup>	21,1 ± 1,0 <sup>ab</sup>	22,4 ± 0,8 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	11,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Zona de inibição incluindo o diâmetro do disco, de 9 mm. Os dados referem-se à média de quatro replicatas ± desvio padrão. Graus de inibição: fraca: 10-13,9 mm; moderada: 14-18 mm; forte: >18 mm. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não são significativamente diferentes (p < 0,05).



**Tabela 4.** Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia* (mg/mL)<sup>a, c</sup>

	Citronela ( <i>C. winterianus</i> )		Eucalipto ( <i>E. paniculata</i> )		Lavanda ( <i>L. angustifolia</i> )	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i>	0,62	2,5	1,25	>10	1,25	5,0
<i>E. faecalis</i>	0,075	5,0	0,075	>10	0,075	>10
<i>L. monocytogenes</i>	0,62	2,5	1,25	>10	1,25	5,0
<i>B. cereus</i>	0,075	2,5	1,25	>10	0,62	2,5
<i>B. subtilis</i>	0,075	1,25	1,25	>10	1,25	2,5
<i>Y. enterocolitica</i>	0,075	0,31	0,075	>10	0,075	2,5
<i>E. coli</i>	NA <sup>b</sup>	NA	NA	NA	2,5	2,5
<i>S. Typhimurium</i>	NA	NA	NA	NA	1,25	>10
<i>E. aerogenes</i>	NA	NA	NA	NA	>10	>10
<i>P. vulgaris</i>	0,31	1,25	0,62	2,5	0,62	1,25
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	2,5	5,0	NA	NA

<sup>a</sup> Os testes foram realizados em triplicata, e os resultados referem-se aos valores modais.

<sup>b</sup> NA: não aplicável, devido à não-deteção de atividade antimicrobiana no teste prévio de difusão em disco.

<sup>c</sup> Em todos os ensaios, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo).

O óleo essencial de citronela apresentou, no ensaio de difusão em disco (Tabela 3), as maiores zonas de inibição observadas para as espécies Gram-positivas *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *B. subtilis*, sendo a atividade contra *S. aureus* equivalente à da ampicilina ( $p < 0,05$ ).

Para *L. monocytogenes*, importante patógeno alimentar, a atividade antibacteriana do óleo essencial de citronela foi equivalente ao cloranfenicol ( $p < 0,05$ ) e semelhante à ampicilina. Esse óleo essencial apresentou ainda excepcional atividade contra as espécies de *Bacillus* testadas, com zonas de inibição significativamente superiores aos antibióticos de referência utilizados. A forte atividade apresentada no ensaio de difusão em disco foi confirmada no ensaio de microdiluição (Tabela 4), em que o óleo essencial de citronela apresentou as maiores atividades (menores valores de CMI e CMB) frente às bactérias Gram-positivas testadas. De acordo com Holetz et al.<sup>26</sup> e Ayres et al.<sup>27</sup>, valores de CMI inferiores a 100 µg/mL (0,1 mg/mL) representam uma boa atividade antimicrobiana; valores situados entre 100 e 500 µg/mL (0,1-0,5 mg/mL) indicam atividade moderada; e valores entre 500 a 100 µg/mL (0,5-1,0 mg/mL) equivalem a uma fraca atividade antimicrobiana. Considerando-se essa faixa de classificação, o óleo essencial de citronela apresentou, nos ensaios de microdiluição, uma boa atividade contra *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *Y. enterocolitica*, e ainda atividade moderada contra *P. vulgaris*.

Os resultados do presente estudo concordam em parte com aqueles apresentados por Scherer et al.<sup>28</sup>, que, avaliando a atividade antimicrobiana de um óleo essencial de citronela de composição química majoritária semelhante à do presente estudo, encontraram valores de CMI para *S. aureus* na faixa de 0,600 a 0,800 mg/mL, compatível com o valor encontrado no presente trabalho. Por outro lado, diferentemente dos autores citados, não detectamos atividade inibitória do óleo de citronela contra *E. coli* e *S. Typhimurium*. Em outro trabalho, Duarte et al.<sup>11</sup> também verificaram atividade inibitória do óleo essencial de citronela contra diversos sorotipos de *E. coli*, porém não apresentam a composição química do óleo em questão, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos. Tipicamente, e também no presente estudo, o composto majoritário (41,8%) desse óleo essencial, citronelal, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Kim et al.<sup>29</sup>.

A dificuldade em comparar os resultados obtidos por vários autores é frequentemente mencionada<sup>30</sup>, e é um problema real enfrentado no estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e produtos derivados de plantas em geral, uma vez que existem inúmeras variações nas metodologias utilizadas, desde o método de preparação do inóculo, passando pelo método de inoculação propriamente dito, à forma de aplicação do óleo essencial, puro ou diluído – e, se diluído, o solvente utilizado, até o volume depositado nos discos, o diâmetro

dos discos e a gramatura do papel, no caso de testes de difusão em disco. Além disso, conforme apontam Cavanagh e Wilkinson<sup>13</sup>, tanto o método de difusão quanto o de diluição foram desenvolvidos e otimizados para testes de susceptibilidade a antibacterianos de natureza hidrofílica, e os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e insolúveis em água. Assim, ainda segundo os autores citados, há a necessidade da padronização de um método robusto e reprodutível para a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, para que os resultados obtidos por diferentes autores sejam passíveis de comparação.

O óleo essencial de eucalipto apresentou, no ensaio de difusão em disco, atividade forte a moderada contra todas as bactérias Gram-positivas testadas. Dentre as espécies Gram-negativas, apresentou atividade contra *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*, destacando-se pela inibição desta última espécie, um micro-organismo que reconhecidamente apresenta resistência a muitos agentes antimicrobianos e desinfetantes<sup>31</sup>.

Considerando-se os valores de CMI determinados, e a mesma classificação de níveis de atividade utilizada para o óleo essencial de citronela, o óleo essencial de eucalipto apresentou boa inibição de *E. faecalis* e *Y. enterocolitica* e uma fraca inibição de *P. vulgaris*. No presente estudo, os valores de CMI e CMB indicam que a utilização do óleo essencial da espécie de eucalipto *E. paniculata*, nas concentrações de 0,25% e 0,5%, resulta em atividade bacteriostática e bactericida, respectivamente, contra *P. aeruginosa*. Se por um lado esses valores indicam uma fraca atividade antimicrobiana em termos de terapêutica anti-infecciosa, por outro lado a aplicação desse óleo essencial pode vir a ser útil na desinfecção de ambientes e utensílios, por exemplo. A atividade antibacteriana desse óleo essencial pode ser explicada pela presença, entre outros constituintes, do composto majoritário  $\alpha$ -pineno (55,47%), que apresenta comprovada atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas<sup>32</sup>.

Os resultados do presente estudo concordam com os dados reportados por Estanislau et al.<sup>17</sup>, que, avaliando a atividade antimicrobiana de cinco espécies de Eucalipto cultivadas em Goiás (*E. cloenziana*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. microcorys* e *E. saligna*) pelo método de difusão em disco, observaram zonas de inibição de *S. aureus* ATCC 6538 variando de 8 a 20 mm e de *E. coli* ATCC 8739 desde 0 (inativo) até 20 mm, conforme a espécie de eucalipto considerada. Gilles et

al.<sup>18</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana de outras três espécies de eucalipto (*E. dives*, *E. olida* e *E. staigeriana*), e também verificaram diferentes perfis de inibição conforme a espécie vegetal em questão. As mesmas cepas ATCC de *S. aureus* e *P. aeruginosa* avaliadas no presente trabalho e *E. faecalis* ATCC 19433 apresentaram zonas de inibição variando de 25 a >90 mm, de 0 a 9,1 mm e de 9,1 a 20,3 mm, respectivamente, comparáveis aos resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, não foram reportados, até o momento, dados referentes à atividade antimicrobiana da espécie *E. paniculata*. Dessa forma, os resultados do presente estudo contribuem para o conhecimento da composição química, bem como da atividade antimicrobiana do óleo essencial dessa espécie vegetal, presente na região Sul do Brasil.

O óleo essencial de lavanda apresentou o maior espectro de ação dentre os óleos essenciais avaliados, tendo sido detectada, no ensaio de difusão em disco, atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados, com exceção de *P. aeruginosa*. Entre os três óleos essenciais estudados, foi o único a apresentar atividade inibitória para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. aerogenes*. No ensaio de difusão em disco, esse óleo essencial apresentou forte atividade contra *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris*, atividade moderada contra *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *E. coli* e ainda uma fraca atividade inibitória frente a *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. aerogenes*. A determinação dos valores de CMI demonstrou boa atividade inibitória de *E. faecalis* e *Y. enterocolitica* e uma fraca inibição de *B. cereus* e *P. vulgaris*, adotando-se o mesmo critério de graduação da atividade inibitória utilizado para os demais óleos essenciais avaliados. O principal constituinte identificado nesse óleo essencial foi o 1,8-cineol (46,78%), previamente reportado<sup>33</sup> como o composto majoritário (65,4%) do óleo essencial obtido a partir das folhas dessa espécie de lavanda. Esse composto demonstrou ser ativo quando testado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Sokovic et al<sup>32</sup> e van Vuuren e Viljoen<sup>34</sup>.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos reportados por Alexopoulos et al.<sup>35</sup> para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. angustifolia* sobre 24 isolados clínicos de *S. aureus* (zona média de inibição de 16 mm e CMI equivalente a aproximadamente 1,0 mg/mL). Azar et al.<sup>36</sup> reportam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *L. angustifolia* obtidos por diferentes métodos de extração. O óleo essencial obtido por hidrodestilação apresentou

valores de CMI (determinados por meio do método de diluição em ágar) para *B. subtilis* ATCC 6633 e *E. coli* ATCC 8739 iguais a 0,5 e 1,0 mg/mL, respectivamente, demonstrando maior atividade do que a verificada no presente trabalho. Contudo, quando se busca comparar resultados obtidos por diferentes autores, é necessário considerar as variações existentes entre as metodologias e cepas empregadas. Além disso, embora se trate da mesma espécie vegetal, a composição química dos óleos essenciais apresenta diferenças, o que reforça a necessidade de se caracterizar os óleos essenciais provenientes de uma determinada região.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. De modo geral, entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos<sup>37</sup>. Cox et al.<sup>38</sup> avaliaram o mecanismo de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, constituído na sua maior parte por monoterpenos cíclicos, sobre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os autores constataram que os efeitos inibitórios do óleo essencial são consistentes com a partição dos constituintes monoterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos. Oyedemi et al.<sup>39</sup> reportam ainda a perda de conteúdo celular, como lipídios e proteínas, como efeitos de alguns componentes de óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

De acordo com Rahman e Kang<sup>4</sup>, o risco de que micro-organismos patogênicos venham a desenvolver resistência aos óleos essenciais é muito baixo, uma vez que esses produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam por meio de diversos mecanismos. Essa é uma característica vantajosa dos óleos essenciais sobre outros agentes antimicrobianos, que pode trazer benefícios nas diversas áreas passíveis de aplicação.

Em conclusão, com relação às bactérias Gram-positivas testadas, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais avaliados, em ordem decrescente, apresentou-se da seguinte forma: citronela > lavanda > eucalipto. Já para as espécies Gram-negativas, a atividade inibitória dos óleos essenciais pode ser classificada na seguinte ordem: lavanda > eucalipto >

citronela. Além disso, na escolha de um óleo essencial para uma determinada aplicação, é importante que seja levado em consideração o micro-organismo de interesse, uma vez que a atividade inibitória foi diferente entre as espécies de um mesmo grupo.

## REFERÊNCIAS

1. Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem*. 1991;30(12):3864-74.
2. Silva Junior AA. *Essentia herba – Plantas bioativas*. Florianópolis (SC): Epagri; 2003.
3. Militello M, Settani L, Aleo A, Mammìna C, Moschetti G, Giammanco GM, et al. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. *Curr Microbiol*. 2011;62:1274-81.
4. Rahman A, Kang SC. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) BSP *J Food Saf*. 2009;29:176-89.
5. Viuda-Martos M, El-Nasser A, El Gendy GS, Sendra E, Fernández-López J, El Razik KAA, et al. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *J Agric Food Chem*. 2010;58:9063-70.
6. Conner DE. Naturally occurring compounds. In: Davidson P, Branen AL (Eds.). *Antimicrobials in foods*. Nova York: Marcel Dekker; 1993. p. 441-68.
7. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007;18(5):414-20.
8. Shasany AK, Lal RK, Patra NK, Darokar MP, Garg A, Kumar S, et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. *Genet Resour Crop Evol*. 2000;47:553-9.
9. Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: a review. *Biores Technol*. 2010;101:372-8.
10. Mendonça FAC, da Silva KFS, dos Santos KK, Ribeiro Júnior KAL, Sant'Ana AEG. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 2005;76:629-36.
11. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol*. 2007;111:197-201.
12. Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Piccoli RH. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(1):8-16.
13. Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res*. 2002;16:301-8.
14. Roller S, Ernest N, Buckle J. The antimicrobial activity of high necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *J Altern Complement Med*. 2009;15(3):275-9.

15. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem*. 2000;48:2576-81.
16. Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Lavender essential oil: a review. *Austr Infect Control*. 2005;10(1):35-7.
17. Estanislau AA, Barros FAZ, Peña AP, Santos SC, Ferri PH, Paula JR. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Rev Bras Farmacogn*. 2001;11(2):95-100.
18. Gilles M, Zhao J, Na M, Agboola S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chem*. 2010;119:731-7.
19. Harborne SB, Baxter H. *Phytochemical Dictionary*. Londres: Taylor and Francis; 1995.
20. Sartorelli P, Marquiere AD, Amaral-Baroli A, Lima MEL, Moreno PRH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother Res*. 2007;21:231-3.
21. Adams RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatographic/Quadrupole Mass Spectrometry*. Carol Stream (IL): Allured; 2001.
22. NCCLS. *The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*. 8ª ed. NCCLS document M2-A8. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
23. Carovic-Stanko K, Orlic S, Politeo O, Strikic F, Kolak I, Milos M, et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chem*. 2010;119:196-201.
24. NCCLS. *The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*. 6ª ed. NCCLS document M7-A6. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
25. Smânia A Jr, Monache FD, Smânia EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J Ethnopharmacol*. 1995;45:177-81.
26. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(7):1027-31.
27. Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(1):90-7.
28. Scherer R, Wagner R, Duarte MCT, Godoy HT. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev Bras Plantas Med*. 2009;11(4):442-9.
29. Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agric Food Chem*. 1995;43:2839-45.
30. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223-53.
31. Russel AD. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J Appl Microbiol*. 1991;71:191-201.
32. Sokovic M, Marin PD, Brkic D, Van Griensven LJLD. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*. 2008;1(2):220-6.
33. Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J Ethnopharmacol*. 2003;89:67-71.
34. Van Vuuren SF, Viljoen AM. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole and in combination. *Flavour Fragr J*. 2007;22:540-4.
35. Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Mantzourani I, Theodoridou I, Stavropoulou E. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*. 2011;17:399-402.
36. Azar PA, Torabbeigi M, Sharifan A, Tehrani MS. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia* isolated by solvent free microwave assisted extraction and hydrodistillation. *J Food Biosci Technol*. 2011;1:19-24.
37. Peter KV (Ed.). *Handbook of herbs and spices*. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004.
38. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*. 2001;6:87-91.
39. Oyedemi SO, Okoh AI, Mabinya LV, Pirochenva G, Afolayan AJ. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr J Biotechnol*. 2009;8(7):1280-6.

# Acceptance of microfiltered milk by consumers aged from 7 to 70 years

## Aceitação de leite microfiltrado por consumidores com idade entre 7 e 70 anos

RIALA6/1493

Rita de Cássia dos Santos Navarro da SILVA, Christiane Mileib VASCONCELOS, Jéssica Yoko SUDA, Valéria de Paula Rodrigues MINIM, Ana Clarissa dos Santos PIRES, Antônio Fernandes de CARVALHO\*

\*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. P. H. Rolfs s. n., Campus da Ufv, CEP: 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. Tel: +55 (31) 3899-1800.

E-mail: antoniofernandes@ufv.br

Recebido: 25.10.2011 – Aceito para publicação: 25.08.2012

### ABSTRACT

Microfiltration of milk reduces its microbial load providing a longer shelf life and preserving its nutritional and sensory characteristics. The present study compared the effect of the microfiltration treatment and of the milk pasteurization regarding the sensory acceptability by consumers aged from 7 to 70 years using a 7-point hedonic scale. The obtained results were evaluated by variance analysis and Duncan's test. Microbiological, acidity, instrumental color and heat treatment extent analyses were also performed. Microfiltered milk showed a higher microbial counting reduction and lower acidity; and lesser change in color coordinates was found when compared to pasteurized milk, indicating the lack of reactions caused by heating. In the sensory acceptability, two groups were formed ( $p > 0.05$ ) for microfiltered milk, being a group consisted of children, adolescents and elderly, who rated the highest sensory scores, and the second one formed by adults. Comparing the two kinds of milk, pasteurized and microfiltered samples, no difference in the acceptance was found only in the group constituted by children. These findings highlight the importance in assessing the sensory quality of milk, seeing that the sensory perception is linked with the consumer purchase choice.

**Keywords.** shelf life, age groups, microfiltration, pasteurization.

### RESUMO

A microfiltração do leite reduz a carga microbiana e proporciona maior vida útil e preservação de suas características nutricionais e sensoriais. O presente estudo comparou o efeito dos tratamentos de microfiltração e de pasteurização de leite quanto à aceitabilidade sensorial pelos consumidores com idade entre 7 e 70 anos, utilizando-se a escala hedônica de 7 pontos. Os resultados foram avaliados pela análise de variância e teste de Duncan. Análises microbiológicas, acidez, cor instrumental e extensão do tratamento térmico também foram realizadas. O leite microfiltrado apresentou maior redução na contagem microbiana, menor acidez e também menor mudança nas coordenadas de cor em comparação ao leite pasteurizado, indicando-se a ausência de reações causadas pelo calor. Na aceitabilidade sensorial, verificou-se a formação de dois grupos diferentes ( $p > 0,05$ ) em relação ao leite microfiltrado: um grupo constituído pelas crianças, adolescentes e idosos, os quais apresentaram maiores escores sensoriais, e outro formado pelos adultos. Na comparação dos dois tipos de leite, somente o grupo constituído pelas crianças não demonstrou diferença entre o leite pasteurizado e o leite microfiltrado quanto à aceitação. Esses dados ressaltam a importância do estudo da qualidade sensorial do leite, porque a percepção sensorial está associada à escolha de compra pelo consumidor.

**Palavras-chave.** vida de prateleira, faixa etária, microfiltração, pasteurização.

## INTRODUCTION

Milk is a biological fluid rich in proteins, fat and minerals making it a high nutritional food source and also a substrate for microbial growth<sup>1</sup>. Therefore, milk for human consumption requires proper treatment for microbial reduction to prevent public health problems. Heat treatment has been used for milk preservation since the beginning of industrialization of this beverage<sup>2</sup>. However, there is a slight loss of nutritional value as a result of this treatment due to protein denaturation and destruction of other sensitive components, such as vitamins and minerals<sup>3</sup>. According to Gandy et al.<sup>4</sup>, drastic heat treatments also cause the loss of sensory quality of milk with the development of tastes, such as a cooked and oxidized flavor, and odors, such as a cooked smell.

The processing of liquid milk by the dairy industry has evolved to apply more drastic heat treatments, such as ultra pasteurization and sterilization, with the objective of extending milk shelf life making it more competitive on the market<sup>2,5</sup>. In recent years, however, the road to competitiveness is no longer the same because consumers have demanded healthier and more natural foods<sup>6</sup>.

Microfiltration technology arose in response to industry needs to adapt to the demands of modern consumers and to survive on the market because the microfiltration process allows to obtain milk with a low microbial load, which preserves its natural constituents, thus, offering a product with an extended shelf life and preserved sensory and nutritional characteristics<sup>7</sup>.

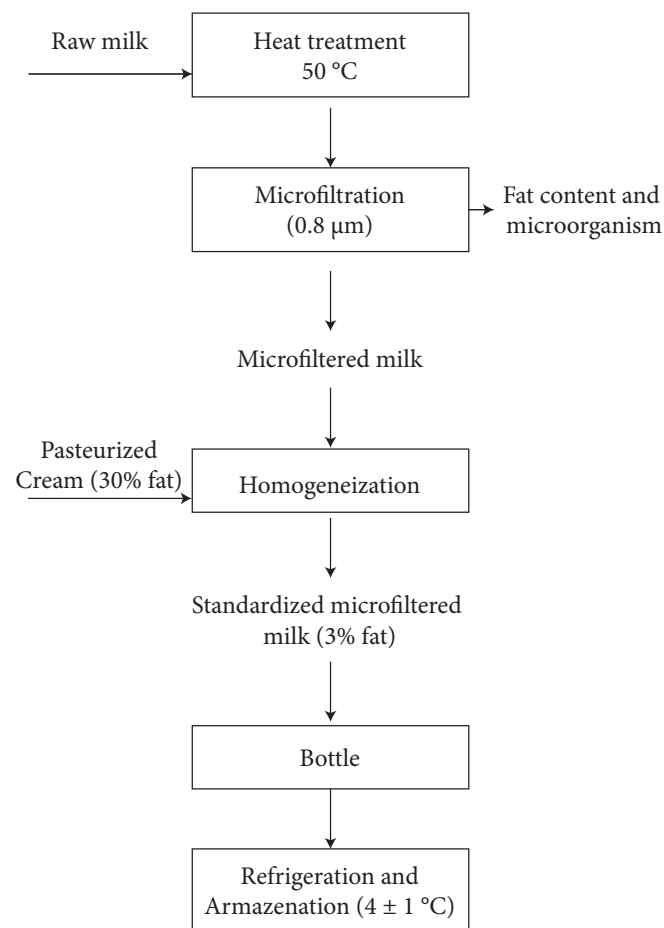
On the other hand, many consumers are resistant to new technologies due to traditional eating habits and lack of knowledge regarding the unconventional conservation methods, which can cause difficulties for the use of microfiltration in the non-thermal treatment of milk<sup>8</sup>. Moreover, according to Chapman and Boor<sup>2</sup>, children and adults behave differently in relation to food making it important to evaluate the sensory acceptability of consumers from different age groups.

In this context, the objective of the present study was to evaluate the effect of thermal (pasteurization) and non-thermal (microfiltration) treatment on drinking milk by considering the physicochemical and microbiological quality of the milk and the influence of the treatments on sensory acceptance of the milk by consumers of different ages.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

The experiment was conducted in a microfiltration pilot scale plant (Tetra Pak Filtration Systems, France) that contained a Sterilox ceramic membrane system with a pore size of 0.8  $\mu\text{m}$ , surface area of 0.24  $\text{m}^2$ , flow of 120  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  liters per hour and a concentration factor of 20:1. Raw milk was skimmed at 30 °C ( $0.4 \pm 0.1\%$  fat; w/w) and heated to 50 °C before being subjected to the microfiltration process as recommended by Carvalho and Maubois<sup>7</sup>. The permeate from the microfiltration process (microfiltered milk) was supplemented with cream previously treated at 80 °C for 15 min<sup>9</sup> and then homogenized. Milk with the standardized fat content of  $3.1 \pm 0.1\%$  (w/w) was immediately stored and cooled to a temperature of  $4 \pm 1$  °C. Figure 1 shows a flowchart of standardized microfiltered milk production.



**Figure 1.** Flow diagram of the acquisition of standardized microfiltered milk

At the same time, a batch of standard milk with  $3.0 \pm 0.2\%$  (w/w) fat was pasteurized at 72 °C for 15 s in a plate heat exchanger (BrasHolanda, Pinhais, Brazil) at the Dairy School of the Department of Food Technology at Federal University of Viçosa in Brazil.

### Microbiological evaluations

Milk samples were collected at the end of the microfiltration process in previously sterilized 200-mL bottles, and the samples were immediately analyzed. The same conditions were applied to the pasteurized milk, pasteurized cream and raw milk samples. Samples were analyzed by enumerated counts of mesophilic aerobes, total coliforms and thermotolerant coliforms using Petrifilm according to methodology recommended by the American Public Health Association<sup>10</sup>. All analyses were performed in duplicate.

### Enzyme indicators of thermal treatment

The extent of heat treatment in milk was evaluated by considering the enzyme activity of phosphatase and peroxidase. The detection of peroxidase was performed using an alcoholic solution of guaiacol and alkaline phosphatase using a kit from Labtest Diagnostica (SA) according to the Official Physical-Chemical Analytical Methods for Control of Milk and Dairy Products<sup>11</sup>.

### Acidity analysis

The determination of acidity of microfiltered and pasteurised milk (expressed as g lactic acid/100 g of milk) was performed according to the AOAC<sup>12</sup> and the Official Physical-Chemical Analytical Methods for Control of Milk and Dairy Products<sup>11</sup>.

### Analysis of color

Color parameters were determined using the Konica Minolta Color Reader CR-10, which performed measurements in an 8-mm reading area. The equipment possessed the following specifications: illuminant CIE D65 (natural daylight) placed at an angle of 8° and CIE 10° standard observer. The Commission Internationale de l'Eclairage (CIELAB) system was used with the following parameters: L\* (luminosity; black = 0 to white = 100), a\* (-a represents green, -60; and +a represents red, +60) and b\* (-b represents blue, -60; and +b represents yellow, +60). Readings were performed in triplicate.

## Sensory evaluation

### Consumers

The group of consumers that participated in sensory tests consisted of volunteers of different ages, which was divided into the following four subgroups with 100 consumers per group: children (group 1); adolescents (group 2); adults (group 3); and the elderly (group 4).

To obtain a more detailed profile of the consumers under study, a questionnaire was proposed to volunteers providing information on their educational level (schooling), family income, frequency of milk consumption, forms of milk consumption, knowledge on the concept of "milk microfiltration" and nutritional importance of milk. The data used from the groups represented by children and the elderly (group 1 and 4, respectively) only encompassed their education level and whether they liked milk.

Data collected via the questionnaire was used to establish a profile of consumers participating in the sensory test using descriptive statistical analysis.

### Sensory acceptability

The acceptance test was performed in different locations as a function of the particularities of each group. For the groups 1 and 2 (7 to 10 year old children and adolescents 11 to 16 years old, respectively), the test was conducted in public schools. For group 3 (adults 17 to 55 years old), the evaluations were performed in the sensory analysis laboratory at the Federal University of Viçosa. For group 4 (elderly 56 to 70 years old), the test was conducted at the center for elderly recreation at the Federal University of Viçosa. Although the test locations were different, the following environmental conditions were controlled: pasteurized and microfiltered milk samples were properly coded; the content volume (mL) provided was standardized; and the temperature was controlled at  $4 \pm 1$  °C.

Because the number of participants recommended in the literature<sup>13,14</sup> for effective tests varies according to the test site (30 consumers in the laboratory and 100 consumers in a central location), a total of 100 consumers per group was standardized.

Because people of different age groups participated in the analysis, different types of hedonic scales were used to meet the peculiarities of each group. Thus, for the groups represented by children (7-10 years old), a facial scale

with seven points was used<sup>2,13,14,15</sup>. For the other groups, a nominal scale with seven points was used<sup>13</sup>.

The acceptance data of microfiltered and pasteurized milk were evaluated by analysis of variance (F-test) for each group. Sensory acceptability of microfiltered milk was also evaluated by comparing the groups together to determine which age group had the greatest acceptance of milk without heat treatment (microfiltered) by F-test and a means test (Duncan's test).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Microbiological Analyses

Table 1 shows the counts of total coliforms, thermotolerant coliforms and mesophilic aerobic microorganisms present in pasteurized and microfiltered milk.

Raw milk showed counts of mesophilic aerobes and total coliforms higher than the maximum limit set by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply<sup>16</sup> suggesting that the raw material used in the experiment was of low quality. On the other hand, the microfiltration process was quite efficient because it removed all forms of vegetative life present in raw milk to undetectable levels, which did not occur with the pasteurization process.

Contamination of the standard microfiltered milk may have been due to the addition of cream, which contributed to a low microbial load in the microfiltered milk. However, this contamination was acceptable because the quantity of microorganisms found in the standardized microfiltered milk was lower than that permitted by Instruction No. 51 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply<sup>16</sup> for pasteurized milk. Even with the addition of cream to the microfiltered milk, the count of mesophilic aerobes was still lower than that of pasteurized milk indicating its greater efficiency in milk processing.

Lawrence et al.<sup>17</sup> affirmed that microfiltration may be used for the separation of microorganisms from the milk because it can reduce the use of high thermal treatment to avoid denaturation of milk proteins.

However, this reduction is dependent on the initial microbial load found in raw milk<sup>18</sup>.

### Enzyme indicators of thermal treatment

During the pasteurization treatment, various milk enzymes are inactivated, and enzyme inactivation assays, such as the alkaline phosphatase test, have been used for years to verify the adequacy of milk pasteurization<sup>3</sup>.

The alkaline phosphatase test showed a positive result for microfiltered milk indicating that this processing technique did not inactivate the enzyme, which occurs with thermal treatment. With respect to pasteurized milk, the test showed a negative result indicating that the milk received appropriate heat treatment. Although alkaline phosphatase was not inactivated in the microfiltration treatment, microbiological analysis showed the superior quality of this milk compared to pasteurized milk.

Peroxidase is not destroyed by slow or fast pasteurization, but it is destroyed by high temperatures. This enzyme exerts an inhibitory action on microorganisms due to the oxidation of protein sulphhydryl groups essential for its metabolism. Peroxidase is used as an indicator of intense heat treatment applied to milk<sup>19</sup>. The peroxidase test showed positive results for both the microfiltered and pasteurized milk indicating that there was no abuse of heat treatment in processing the milk.

### Milk Acidity

According to Brazilian legislation<sup>16</sup>, milk naturally has a certain acidity at the time at which it is obtained ranging from 0.14 to 0.18 g lactic acid per 100 mL of milk. Legislation considers milk to be sour when presenting acidity greater than 0.18% (w/v), which may result from milk acidification by microorganisms multiplying within the product itself that metabolize lactose and produce lactic acid. In the present study both the microfiltered and pasteurized milk had acidity values within those permitted by legislation with acidity values of 0.16 and 0.18% for microfiltered and pasteurized milk, respectively.

**Table 1.** Count of mesophilic aerobic, total and thermo- tolerant coliforms in samples of raw, pasteurized and microfiltered milk, pasteurized cream and standardized microfiltered milk

Samples	Total coliforms (CFU.mL <sup>-1</sup> )	Thermo-tolerant coliform (CFU.mL <sup>-1</sup> )	Mesophilics (CFU.mL <sup>-1</sup> )
Raw milk	2.4 × 10 <sup>5</sup>	< 1 × 10 <sup>1</sup>	2.9 × 10 <sup>6</sup>
Pasteurized milk	< 1 × 10 <sup>1</sup>	< 1 × 10 <sup>1</sup>	1.8 × 10 <sup>3</sup>
Microfiltered milk	< 1 × 10 <sup>1</sup>	< 1 × 10 <sup>1</sup>	< 1 × 10 <sup>1</sup>
Pasteurized cream	< 1 × 10 <sup>1</sup>	< 1 × 10 <sup>1</sup>	1.3 × 10 <sup>2</sup>
Standardized microfiltered milk	< 1 × 10 <sup>1</sup>	< 1 × 10 <sup>1</sup>	4.0 × 10 <sup>0</sup>



**Table 2.** Color coordinates  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  for the microfiltered and pasteurized milks

Samples	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Standardized microfiltered milk	$67.9 \pm 0.2$	$-1.1 \pm 0.1$	$5.1 \pm 0.1$
Pasteurized milk	$76.5 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.1$	$12.6 \pm 0.1$

### Instrumental evaluation of color

Color is one of the most important attributes of acceptability and quality of food products<sup>20</sup>. Table 2 shows the values for the  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  parameters of microfiltered and pasteurized milk.

Both microfiltered and pasteurized milk may be considered clear because the  $L^*$  values were greater than 50 ( $L^* > 50$ )<sup>21</sup>, and the pasteurized milk had a higher luminosity than microfiltered milk.

For pasteurized milk,  $a^*$  and  $b^*$  values were positive indicating that they were in the red and yellow regions. Padilha et al.<sup>22</sup> reported that the combination of positive  $a^*$  and  $b^*$  values result in a brown color. Jing and Kitts<sup>23</sup> and Dattatreya and Rankin<sup>24</sup> affirmed that factors, such as reducing sugar, moisture, structure of particles contained in food, temperature and pH, involved in the processing of milk or dairy derivatives contribute to the Maillard reaction, thereby generating changes in color. Additionally, Chevalier et al.<sup>25</sup> reported that the Maillard reaction may occur in the less extreme processing steps, i.e., an intense chemical catalyst is not necessarily required for reactions to occur.

According to Dattatreya and Rankin<sup>24</sup>, the highest  $b^*$  values obtained for pasteurised milk are related to the intermediate phase of the Maillard reaction where there is an increased production of yellow compounds.

The  $a^*$  values obtained for microfiltered milk in the present study indicated that it was greener than pasteurized milk because no interference of reactions between milk components occurred due to heat treatment in pasteurized milk.

### Sensory evaluation

#### Consumers

The socioeconomic and cultural profile of consumers who participated in the sensory analysis representing the age group from 17 to 55 years (group 3) consisted of people who were heterogeneous in terms of socioeconomic and social variables. It was represented by a majority with a higher level of education (incomplete higher education 81.6%) and intermediate socioeconomic level (US\$ 302 to US\$ 2718 per month 76%).

The frequency of milk consumption varied widely in this group, with 60.5% of the consumers drinking milk more than 5 times a week, which may be the result of a wide range of consumer ages comprising this group (17 to 55 years old). According to the Milk Industry Foundation<sup>26</sup>, milk consumption is in an inverse relation to the age of the consumers.

Regarding the type of milk consumed, there was a greater consumption of ultra high temperature (UHT 56.7%) milk followed by milk with a smoother heat treatment (pasteurized: HSTS – high temperature short time 35.6%). The form of milk consumption was often based on the addition of other ingredients (especially powdered chocolate 55.1% and coffee 27.5%) with only a small percentage of consumers (8.2%) with a habit of drinking plain milk. These results were consistent with the findings reported by Sampaio and Da Silva<sup>27</sup> when evaluating the milk consumption habits of the Brazilian population. Sampaio and Da Silva<sup>27</sup> found that only 2% of surveyed consumers drink plain milk, and they also reported that 52% of the surveyed consumers drink milk with chocolate powder and that 41% add milk to coffee.

When the term “microfiltered milk” was mentioned to consumers, explaining the process and its nutritional influence, most of than approximately 70.7%, had an understanding with respect to application of the milk microfiltration process and its implication on health. This result may be due to the significant percentage (62%) of consumers who had attended college.

#### Acceptability among different age groups

Table 3 shows the average acceptance of microfiltered and pasteurized milk for consumers of different age groups. The group represented by children (7-10 years old) was the only group that did not discriminate the samples with respect to acceptance, by F-test ( $p > 0.05$ ). According to Kimmel et al.<sup>28</sup>, children are eager to please adults reflecting the inclination to confirmatory or socially desirable responses. Other difficulties that may be encountered in research with young children include their shorter attention span and the fact that their cognitive abilities are not yet fully developed, which may result in extreme or random results<sup>15,29,30,31,32</sup>.

On the other hand, adolescents (11 to 16 years) were able to discriminate the microfiltered and pasteurized milk samples ( $p < 0.05$ ) assigning scores between the hedonic terms “like” and “liked very much”, in the seven points scales, for the two samples, with a significant preference for the microfiltered milk. According to Gandy et al.<sup>4</sup> and Chapman and Boor<sup>2</sup>, heat treatment causes a strong cooked flavor in milk that is unfavorable with regard to sensory acceptability of consumers in this age group.

The adult group (17-55 years old) indicated that they did not like microfiltered milk assigning scores between the terms “disliked” and “indifferent”. In relation to pasteurized milk, the consumer group studied showed slight product acceptance by assigning scores between the terms of “indifferent” and “liked”. The low sensory acceptability of the assessed milk types may be attributed to consumers not having a habit of drinking plain milk.

For the elderly group, sensory acceptability of the two milk types (microfiltered and pasteurized) was satisfactory with a significant preference for pasteurized milk reflecting the habitual consumption of this beverage. According to Chapman and Boor<sup>2</sup>, this preference is due to the accentuated cooked taste of heat-treated milk reflecting the preference of pasteurized milk among older consumers.

Table 3 also presents a comparison of the acceptance of microfiltered milk among different age groups. The groups represented by children, adolescents and elderly showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) in relation to sensory acceptability. Moreover, the group of adults (17 to 55 years old) showed significant difference ( $p < 0.05$ ) in relation to sensory acceptability indicating lower acceptance of the microfiltered milk.

**Table 3.** Sensory acceptance of microfiltered and pasteurized milk in different age groups

Consumers	Microfiltered milk	Pasteurized milk
Children	5.7 <sup>aa</sup>	5.9 <sup>a</sup>
Adolescents	5.8 <sup>aa</sup>	5.1 <sup>b</sup>
Young adults and Adults	3.6 <sup>bb</sup>	4.7 <sup>a</sup>
Elderly	5.8 <sup>ba</sup>	6.1 <sup>a</sup>

Lowercase letters in the lines indicate significant difference ( $p < 0.05$ ), by test F. Capital letters in the column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ), by test of Duncan

These results indicated a potential market for the microfiltered milk because most consumers (75%) demonstrated good acceptance for this milk. The sensory

unacceptability of microfiltered milk of the adult group may be due to the habit of adults of not consuming plain milk normally, which was the condition of the sensory test.

## CONCLUSION

The application of microfiltration membrane technology allows the food industry to use a new tool capable of improving the microbiological quality of dairy products. In the present study, microfiltration was more effective than pasteurization in reducing the microbial load present in raw milk, which may result in a longer shelf life of products originating from such milk. The evaluated physicochemical parameters also presented values in accordance to Brazilian legislation for pasteurized milk.

Regarding acceptance, it was clear that both the microfiltered and pasteurized milk showed good acceptance with the exception of consumers between 17 and 55 years suggesting a large potential market for microfiltered milk. However because consumers are accustomed to the taste of cooked milk, the revival of an appreciation for the taste of raw milk is needed, which would allow greater acceptance and use of this milk for consumption or as an ingredient in various products.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the CNPq and Fapemig for their financial support.

## REFERENCES

1. Robison R. Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products. 3. ed. Chichester: Wiley-Interscience; 2002.
2. Chapman KW, Boor KJ. Acceptance of 2% ultra-pasteurized milk by consumers, 6 to 11 years old. *J Dairy Sci*. 2001;84(4):951-4.
3. Varnam AH, Sutherland JP. Milk and Milk Products: technology, chemistry and microbiology. Gaithersburg: Aspen; 2001.
4. Gandy AL, Schilling MW, Coggins PC, White CH, Yoon Y, Kamadia VV. The effect of pasteurization temperature on consumer acceptability, sensory characteristics, volatile compound composition, and shelf-life of fluid milk. *J Dairy Sci*. 2008;91(5):1769-77.
5. Hough G, Sánchez RH, Garbarini de Pablo G, Sánchez RG, Calderón Villaplana S, Giménez AM, et al. Consumer acceptability versus trained sensory panel scores of powdered milk shelf-life defects. *J Dairy Sci*. 2002;85(9):2075-80.
6. Romeih EA, Michaelidou A, Biliaderis CG, Zerfiridis GK. Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and

- two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *Int Dairy J*. 2002;12(6):525-40.
7. Carvalho AF, Maubois JL. Applications of Membrane Technologies in the Dairy Industry. *In: Comibra JSR, org. Engineering Aspects of Milk and Dairy Products*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2009. p. 43-68.
  8. Deliza R, Rosenthal A, Silva ALS. Consumer attitude toward information on non-conventional technology. *Trends Food Sci Tech*. 2003;14(1-2):43-9.
  9. Avalli A, Povolò M, Carminati D, Contarini G. Significance of 2-heptanone in evaluating the effect of microfiltration/pasteurization applied to goats' milk. *Int Dairy J*. 2004;14(10):915-21.
  10. APHA. American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4. ed. Washington: APHA; 2001.
  11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº 28, de 12 de dezembro de 2006*. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 2006.
  12. AOAC. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. 15. ed. Washington (DC); 1990.
  13. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. *Sensory Evaluation Techniques*. 4. ed. Boca Raton: CRC Press; 2006.
  14. Minim VPR. *Análise Sensorial – Estudo com Consumidores*. 2. ed. Viçosa (MG): Editora da Universidade Federal de Viçosa; 2010.
  15. Zeinstra GG, Koelen MA, Colindres D, Kok FJ, De Graaf C. Facial expressions in school-aged children are a good indicator of “dislikes”, but not of “likes”. *Food Qual Prefer*. 2009;20(8):620-4.
  16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2002, Seção I, 172, 8-13.
  17. Lawrence ND, Kentish SE, O'Connor AJ, Barber AR, Stevens GW. Microfiltration of skim milk using polymeric membranes for casein concentrate manufacture. *Sep Purif Technol*. 2008;60(3):127-244.
  18. Saboya L, Maubois JL. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait*. 2000;80(6):541-53.
  19. Silveira PR, Abreu LR. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. *Ciênc Agrotec*. 2003;27(6):1340-7.
  20. Hutchings JB. *Food colour and appearance*. 2. ed. Gaithersburg: Aspen; 1999.
  21. Cohen KO, Jackix MNH. Estudo do licor de cupuaçu. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(1):182-90.
  22. Padilha VM, Rolim PM, Salgado SM, Livera AS, Andrade SAC, Guerra NB. Perfil sensorial de bolos de chocolate formulados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):735-40.
  23. Jing H, Kitts DD. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(7):1007-15.
  24. Dattatreya A, Rankin SA. Moderately acidic pH potentiates browning of sweet whey powder. *Int Dairy J*. 2006;16(7):822-8.
  25. Chevalier F, Chobert JM, Popineau Y, Nicolas MG, Haertle T. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *Int Dairy J*. 2001;11(3):145-52.
  26. Milk Industry Foundation. *Milk Facts*. International Dairy Foods Association, Washington, DC. Publication #F-22200; 1999.
  27. Sampaio KL, Da Silva MAA. Percepções e consumo de jovens universitárias brasileiras em relação ao leite fluido industrializado: um estudo de caso. *Alim Nutr*. 2004;15(1):23-30.
  28. Kimmel SA, Sigman-Grant M, Guinard JX. Sensory testing with young children. *Food Technol*. 1994;48:92-9.
  29. Chambers CT, Johnston C. Developmental differences in children's use of rating scales. *J Pediatr Psychol*. 2002;27(1):27-36.
  30. Guinard J. Sensory and consumer testing with children. *Trends Food Sci Tech*. 2000;11(8):273-83.
  31. Liem DG, Mars M, De Graaf C. Consistency of sensory testing with 4- and 5-year-old children. *Food Qual Prefer*. 2004;15:541-8.
  32. Popper R, Kroll JJ. Conducting sensory research with children. *J Sens Stud*. 2005;20(1):75-87.

# Aceitabilidade sensorial de massa de pizza acrescida de farinhas de trigo integral e de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) entre adolescentes

## Sensory acceptability of the whole wheat and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) flours-added pizza dough among adolescent customers

RIALA6/1494

Camila Bossoni RUSSO<sup>1</sup>, Caroline Finger SOSTISSO<sup>1</sup>, Isadora Nogueira PASQUAL<sup>1</sup>, Daiana NOVELLO<sup>1\*</sup>, Herta Stutz DALLA SANTA<sup>2</sup>, Mateus Gatti BATISTA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), Guarapuava, PR. (42) 3629-8182. E-mail: nutridai@hotmail.com

<sup>2</sup>Setor de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicentro, Guarapuava, PR

<sup>3</sup>Faculdade Campo Real, Guarapuava, PR

Recebido: 19.11.2011 – Aceito para publicação: 07.09.2012

### RESUMO

A linhaça é um ingrediente muito utilizado em produtos alimentícios como pães, biscoitos e massas em geral, em função de seus componentes benéficos. Neste trabalho, foram desenvolvidas formulações de massas de pizzas enriquecidas com farinha de trigo integral e linhaça. Verificou-se a aceitabilidade sensorial entre adolescentes e a composição físico-química da formulação padrão e mais aceita contendo linhaça. Foram elaboradas cinco massas de pizzas salgadas, sendo uma formulação padrão (FP) e as demais, contendo diferentes proporções de farinha linhaça: 2,5% (F1), 5,0% (F2), 7,5% (F3) e 10,0% (F4). Não houve diferença significativa entre as amostras para os atributos aparência, aroma e sabor e, em geral, verificou-se que as formulações FP e F2 apresentaram maiores notas de aceitabilidade geral do que F3, sem diferença nas demais. As massas FP e F4 apresentaram maior intenção de compra do que F3 ( $p < 0,05$ ). A adição de linhaça às formulações proporcionou maior teor de proteínas, lipídios e fibra bruta ( $p < 0,05$ ). Houve viabilidade da adição de farinha de trigo integral e linhaça nas formulações de massas de pizzas, uma vez que os resultados foram satisfatórios e bem aceitos pelos consumidores, e que representam uma opção mais nutritiva e saborosa para a alimentação dos adolescentes.

**Palavras-chave.** pizza, linhaça, alimento funcional, fibra alimentar.

### ABSTRACT

Flaxseed is an ingredient widely used in food products such as breads, biscuits and pasta in general, due to its beneficial components. The objective of this study was to develop pizza dough enriched with whole wheat and flaxseed flours, and to assess its sensory acceptability among adolescents, as well as to perform the physicochemical composition analysis of the standard formulation and most accepted containing flaxseed. Five salty pizza dough formulations were prepared, being one standard (FS) and the other containing different proportions of flaxseed flour: 2.5% (F1), 5.0% (F2), 7.5% (F3) and 10.0% (F4). No significant differences were found among the samples for appearance, aroma and flavor attributes, and in a general way the F2 and FS formulations got higher acceptability scores than F3, with no difference in the others. FS and F4 formulations were scored a higher buying intention than F3 ( $p < 0.05$ ). By adding flaxseed into the formulations, the protein, fat and crude fiber contents increased ( $p < 0.05$ ). It is feasible to add the whole wheat flour and the linseed into the pizza dough formulations, seeing that the results were satisfactory and they were well accepted by consumers, representing a more nutritious and palatable food option for adolescents.

**Keywords.** pizza, flaxseed, functional food, dietary fiber.

## INTRODUÇÃO

A adolescência compreende o período de vida que vai dos 10 aos 19 anos de idade, sendo classificada como a fase que vem depois da infância e antes da vida adulta. Durante a adolescência, é comum ocorrer intensas transformações hormonais, psicológicas e no consumo alimentar, no qual, observa-se nessa fase, a preferência de alimentos ricos em açúcares, com alto teor de lipídios, alimentos industrializados, além do alto consumo de bebidas alcoólicas<sup>1</sup>.

As escolhas alimentares dos adolescentes podem ser influenciadas de diversas maneiras, incluindo a crescente independência, o maior envolvimento na vida social, insatisfação com a imagem corporal, influências da mídia, alimentação fora de casa, facilidade de preparo e praticidade do consumo (lanches, pizzas, *fast foods*). Sabe-se que os hábitos alimentares desenvolvidos durante a adolescência podem durar até a idade adulta. Além disso, a ingestão de nutrientes específicos durante a adolescência pode influenciar em um risco futuro de doenças crônicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose. Também, está relacionada ao aumento da prevalência de obesidade entre adolescentes, o que também aumenta o risco de obesidade na vida adulta<sup>1-3</sup>.

Na busca de reduzir os gastos com saúde pública e melhorar a qualidade da alimentação desses jovens, uma vez que a expectativa de vida da população brasileira aumentou consideravelmente, surgem no mercado preparações acrescidas de alimentos funcionais. O Comitê de Alimentos e Nutrição do Instituto de Medicina (IOM)<sup>4</sup> definiu alimentos funcionais como “qualquer alimento ou ingrediente que possa proporcionar um benefício à saúde, além dos nutrientes tradicionais que ele contém”<sup>5</sup>.

Atualmente, alimentos funcionais representam um importante papel na indústria alimentícia, sendo incorporados a produtos de panificação em função da preocupação com a saúde dos consumidores<sup>6</sup>.

Vários ingredientes funcionais podem ser misturados à farinha de trigo comum para uso em produtos de panificação, denominando-se farinha mista ou composta, tornando esse alimento enriquecido nutricionalmente<sup>5</sup>.

Dentre os alimentos funcionais, a linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é de grande interesse na incorporação de produtos alimentícios como pães, biscoitos e massas em geral, devido aos seus componentes benéficos. É rica

em fibras e em ácidos graxos essenciais, com elevado teor de lipídios, sendo que, destes, 57% são de ácidos graxos ômega-3 ( $\omega$ -3), 16% de ômega-6 ( $\omega$ -6), 18% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e 9% de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), além dos saturados<sup>5,7</sup>.

A predominância do  $\omega$ -3 em relação ao  $\omega$ -6, de razão 3:1 na semente da linhaça, tem sido correlacionada com a prevenção das doenças coronarianas e câncer. O potencial antioxidante e outros efeitos benéficos da semente são decorrentes da presença de vitamina E, A, B, D, K,  $\beta$ -caroteno, glicosídeos, linamarina, taninos e mucilagem. A linhaça apresenta ainda um elevado teor de potássio, sendo cerca de sete vezes maior que o da banana<sup>5,7</sup>.

A fibra alimentar é uma substância resistente à ação das enzimas digestivas humanas e é considerada o principal componente de vegetais, frutas e grãos integrais, razão esta que permitiu que esses alimentos pudessem ser caracterizados como alimentos funcionais, já que a sua utilização dentro de uma dieta equilibrada pode reduzir o risco de algumas doenças, além de agregar uma série de benefícios<sup>8</sup>.

Uma forma de incrementar o teor de fibras e  $\omega$ -3 na dieta envolve a adição de farinha integral e farinha de linhaça na elaboração de produtos frequentemente consumidos pelos adolescentes. Dentre eles está incluída a pizza, já que é um alimento tradicionalmente consumido pelo sabor, preparo rápido e fácil e disponibilidade de ser encontrado semipronto ou pronto<sup>9</sup>.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver massas de pizzas enriquecidas com farinha de trigo integral e linhaça e verificar a aceitabilidade sensorial entre adolescentes, bem como realizar a análise da composição físico-química do produto com maior teor de ingrediente e com aceitação sensorial semelhante a padrão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo das formulações

Os ingredientes foram pesados em uma balança digital (Filizola® Platina, Brasil) com precisão de 0,1 g e capacidade máxima de 15 kg, no Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro).

Para a realização do estudo, foram elaboradas cinco massas de pizzas salgadas com diferentes formulações, sendo uma massa padrão contendo apenas farinha de trigo branca (FP) e as demais, adicionadas

de diferentes proporções de farinha de trigo integral e linhaça. Para fins de classificação das formulações, consideraram-se apenas as amostras adicionadas de farinha de linhaça (FL), sendo: 2,5% (F1), 5% (F2), 7,5% (F3) e 10% (F4), conforme pode ser visualizado na Tabela 1. Essas porcentagens de adição foram selecionadas após testes sensoriais preliminares realizados com o produto.

Os ingredientes água morna e fermento foram misturados e permaneceram em repouso por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se açúcar, sal, ovos, margarina, farinha de trigo branca, farinha de trigo integral e FL nas proporções apresentadas na Tabela 1. Os ingredientes foram misturados manualmente até formar uma massa homogênea, que permaneceu em repouso por 40 minutos. Logo após, as massas foram abertas em forma circular com o auxílio de um rolo, sendo que a espessura aproximada das formulações foi de 0,7 cm. Logo em seguida, as amostras foram assadas em forno (Brastemp® Clean, Brasil), na temperatura de 200 °C, por aproximadamente 15 minutos.

**Tabela 1.** Formulações de massas de pizza com diferentes concentrações de farinha de linhaça (FL)

Ingredientes	FP (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
Farinha branca	56,50	28,34	24,98	25,65	18,25
Farinha integral	0,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Farinha de linhaça	0,00	2,50	5,00	7,50	10,00
Fermento biológico	3,02	3,07	3,13	2,91	3,25
Açúcar refinado	6,04	6,13	6,25	5,81	6,49
Água	22,36	22,7	23,13	21,51	24,03
Sal	0,6	0,61	0,63	0,58	0,65
Ovos	5,44	5,52	5,63	5,23	5,84
Margarina	6,04	6,13	6,25	5,81	6,49

\*FP: padrão; F1: 2,5% de FL; F2: 5,0% de FL; F3: 7,5% de FL; F4: 10,0% de FL.

### Avaliação sensorial

Participaram da pesquisa 50 provadores não treinados<sup>4</sup>, sendo estudantes de uma escola estadual do município de Guarapuava (PR), de ambos os sexos, com idade entre 14 e 18 anos.

Os produtos foram submetidos à análise sensorial em uma sala própria da escola, sendo avaliado um aluno por vez. Cada prova foi feita em cabines tipo urnas, sendo que o provador foi auxiliado pelas pesquisadoras para o preenchimento das repostas.

O julgamento sensorial avaliou os atributos de aparência, aroma, sabor, textura e cor, segundo metodologia de Dutcosky<sup>10</sup>. Nessa etapa, todas as amostras

foram aquecidas previamente por 10 minutos em forno (180 °C), sendo servidas à temperatura interna média de 25 °C. As mesmas foram analisadas por meio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de “desgostei muitíssimo” (nota 1) a “gostei muitíssimo” (nota 9). Aplicaram-se também questões de aceitação global e intenção de compra, avaliadas por meio de dois pontos específicos entre “sim” (compraria a amostra) e “não” (não compraria a amostra), como sugerido por Moskowitz<sup>11</sup>.

A cada julgador foi entregue um pedaço de cada amostra (aproximadamente 10 g), em pratos plásticos brancos, codificados com números de três dígitos, de forma casualizada e balanceada, acompanhados de um copo de água para realização do branco entre as amostras. As formulações foram oferecidas aos julgadores de forma monádica sequencial.

### Análise da composição físico-química

A análise físico-química dos produtos foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicentro. As seguintes determinações foram realizadas, em triplicata, na formulação padrão (F1) e naquela com maior teor de linhaça e aceitação sensorial semelhante a padrão em todos os atributos:

*Determinação da umidade* foi realizada pelo método de perda por dessecação de acordo com o Instituto Adolfo Lutz<sup>12</sup>; *determinação de cinzas*, pelo método de resíduo por incineração de acordo com o recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>12</sup>; *determinação de proteínas*, pelo método clássico de Kjeldahl, preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>12</sup>; *determinação de lipídios*, por extração com solvente frio de acordo com Bligh e Dyer<sup>13</sup>; *determinação de carboidratos* foi realizada por diferença, isto é, a fração de carboidratos corresponde a 100 menos a somatória das frações proteica, lipídica, cinzas e umidade; *determinação de fibra bruta*, conforme a metodologia do Instituto Adolfo Lutz<sup>12</sup>; e *determinação do valor calórico* por meio da utilização dos coeficientes de Atwater (carboidratos: 4 kcal/g; lipídios: 9 kcal/g; proteínas: 4 kcal/g).

### Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do *software* Statgraphics Plus®, versão 5.1, por meio da análise de variância (ANOVA), sendo que a comparação de médias foi realizada pelo teste de médias de Tukey, t de *student* e Qui-quadrado de McNemar, todos avaliados com nível de 5% de significância.

### Questões éticas

Para a realização da pesquisa, os responsáveis pelos menores de idade assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, respeitando-se as questões éticas, no qual o pesquisador responsável se responsabilizava por assegurar a integridade física e moral aos sujeitos que participavam do estudo e a desistir a qualquer momento sem ônus ou risco ao indivíduo. A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Unicentro (COMEP/Unicentro) sob o parecer nº 116/2011.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação sensorial

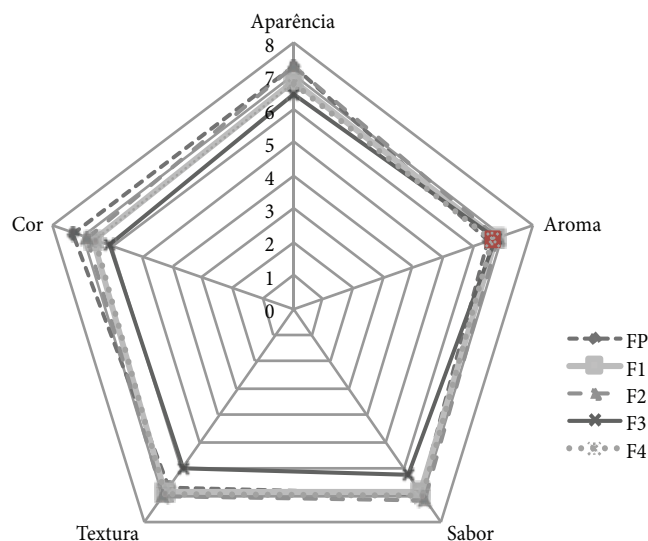
A Figura 1 descreve o gráfico radar que foi utilizado para uma melhor visualização do perfil hedônico das amostras de pizza, salientando suas similaridades e diferenças. O centro da figura representa o ponto zero da escala e a magnitude aumenta do centro para periferia. A média de cada atributo por amostra é marcada no eixo correspondente, onde o perfil sensorial é traçado pela vinculação dos pontos.

A Figura 1 sugere que houve diferença entre os valores hedônicos das massas de pizza, principalmente com relação à aparência, sabor, textura e cor. Para confirmação, realizou-se ANOVA e o teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Por meio da Tabela 2, verifica-se os resultados médios obtidos na análise sensorial.

Não houve diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ) para os atributos aparência, aroma e sabor. Dados semelhantes foram observados por Silva

et al.<sup>14</sup>, que avaliaram bolo de chocolate adicionado de diferentes concentrações de FL.



**Figura 1.** Valores hedônicos para os atributos das formulações de massas de pizzas padrão (FP) e adicionadas de 2,5% (F1), 5,0% (F2), 7,5% (F3) e 10,0% (F4) de farinha de linhaça

Porém, no atributo textura, a formulação F2 obteve nota maior ( $p < 0,05$ ) que F3, sendo semelhante aos demais. Entretanto, Lima<sup>15</sup>, ao avaliar a textura de pães adicionados de FL e de maracujá, verificaram maiores notas na formulação padrão do que naquelas com 7% de FL.

Em relação à característica de cor, verificou-se que a formulação FP obteve nota significativamente maior que F3, sendo semelhante às demais. Corroborando esses resultados, Maciel et al.<sup>5</sup>, ao avaliar a cor de biscoitos tipo

**Tabela 2.** Médias do teste sensorial afetivo e intenção de compra realizados para as formulações de massas de pizzas padrão e adicionadas de 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0% de farinha de linhaça (FL)

Formulações/ Atributos	FP		F1		F2		F3		F4	
	Média ± DP	EPM	Média±DP	EPM	Média±DP	EPM	Média±DP	EPM	Média±DP	EPM
Aparência*	7,29±1,81 <sup>a</sup>	0,25	6,86±1,52 <sup>a</sup>	0,21	7,27±1,36 <sup>a</sup>	0,19	6,43±1,78 <sup>a</sup>	0,25	6,76±2,15 <sup>a</sup>	0,30
Aroma*	6,53±2,08 <sup>a</sup>	0,29	6,80 ±1,50 <sup>a</sup>	0,21	6,84±1,50 <sup>a</sup>	0,21	6,76±1,46 <sup>a</sup>	0,20	6,65±2,00 <sup>a</sup>	0,28
Sabor*	6,92±2,10 <sup>a</sup>	0,29	6,84±2,12 <sup>a</sup>	0,30	7,16±2,03 <sup>a</sup>	0,28	6,21±2,39 <sup>a</sup>	0,33	6,98±2,13 <sup>a</sup>	0,30
Textura*	6,72±1,99 <sup>ab</sup>	0,28	6,86±1,78 <sup>ab</sup>	0,25	6,98±1,67 <sup>a</sup>	0,23	5,94±2,01 <sup>b</sup>	0,28	6,94±1,90 <sup>ab</sup>	0,27
Cor*	7,29±1,90 <sup>a</sup>	0,27	6,65±1,82 <sup>ab</sup>	0,25	6,86±1,77 <sup>ab</sup>	0,25	6,08±2,08 <sup>b</sup>	0,29	6,60±2,02 <sup>ab</sup>	0,28
<b>Aceitação Global Positiva (sim)** (%)</b>										
	78,43 <sup>a</sup>		74,51 <sup>ab</sup>		76,47 <sup>a</sup>		58,82 <sup>b</sup>		68,63 <sup>ab</sup>	
<b>Intenção de Compra Positiva (sim)** (%)</b>										
	66,67 <sup>a</sup>		58,82 <sup>ab</sup>		60,78 <sup>ab</sup>		45,10 <sup>b</sup>		66,67 <sup>a</sup>	

\*letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\*letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado de McNemar ( $p < 0,05$ ).

DP: Desvio padrão da média; EPM: Erro padrão da média; FP: padrão; F1: 2,5% de FL; F2: 5,0% de FL; F3: 7,5% de FL; F4: 10,0% de FL.

cracker adicionados de FL, também encontraram maior média para a formulação padrão, com diminuição no atributo cor à medida que houve aumento do incremento de FL.

Quanto à aceitação global positiva, constatou-se que as formulações padrão e F2, apresentaram notas maiores que F3 ( $p < 0,05$ ), sem diferença das demais. Entretanto, todas as amostras permaneceram com resultados acima de 50%, podendo ser consideradas com boa aceitação, em geral. Respostas semelhantes foram observadas por Frozza et al.<sup>9</sup>, que avaliaram diferentes formulações de massas de pizzas acrescidas de farinhas fontes de fibras.

As amostras FP e F4 apresentaram maior intenção de compra que F3 ( $p < 0,05$ ), sendo semelhante às demais. Porém, nota-se que as outras formulações tiveram porcentagens de intenção de compra semelhantes a padrão e acima de 50%, o que demonstra uma possível viabilidade na comercialização dos produtos.

Por meio da Figura 2, observa-se a distribuição percentual das notas informadas pelos provadores para os atributos aparência, aroma, sabor, textura e cor das cinco formulações.

As avaliações gostei muito (8) e gostei moderadamente (7) foram as mais assinaladas para o atributo aparência, enquanto no atributo aroma, a nota 7 foi apontada para a maioria das amostras estudadas. Resultados similares foram relatados por Lima<sup>15</sup>, ao avaliarem o aroma de formulações de pães adicionados de FL e farinha de maracujá.

Em relação ao sabor, as opções gostei muito (8) e gostei muitíssimo (9) foram as mais informadas pelos provadores. Já na textura, a nota 8 foi a mais marcada pelos provadores, correspondendo às formulações com 5,0% e 10,0%. As notas 7 e 8 foram as mais informadas pelos provadores no quesito cor.

De acordo com as notas obtidas no teste sensorial afetivo, optou-se pela formulação com 5% de adição de

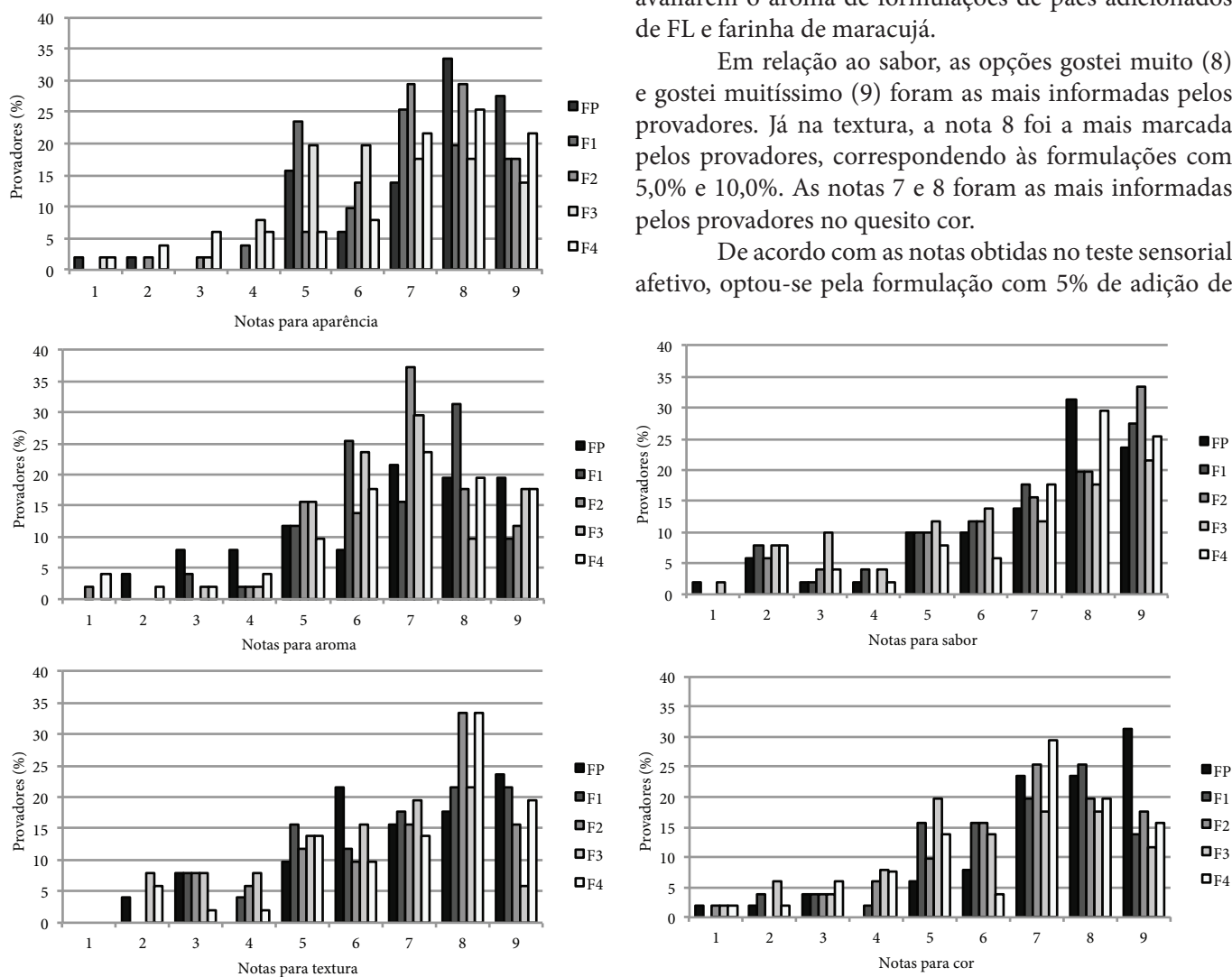


Figura 2. Frequência de notas para os atributos aparência, aroma, sabor, textura e cor das massas de pizza padrão (FP) e adicionadas de 2,5% (F1), 5,0% (F2), 7,5% (F3) e 10,0% (F4) de farinha de linhaça



**Tabela 3.** Composição físico-química das massas de pizza padrão e acrescida de 5,0% de farinha de linhaça (FL), comparadas com porcentagem de valores diários recomendados – VD\* (porção média de 100 gramas) e um produto referência\*\*\*

Avaliação	FP		F2		Referência***
	Média±DP	% VD*	Média±DP	% VD*	
Umidade (%)**	14,67 ± 0,36 <sup>a</sup>	ND	12,49 ± 0,42 <sup>b</sup>	ND	42,00
Cinzas (%)**	1,53 ± 0,01 <sup>b</sup>	ND	2,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	ND	ND
Valor calórico (kcal)**	437,28 ± 0,26 <sup>b</sup>	21,86	444,11 ± 0,18 <sup>a</sup>	22,20	314,19
Carboidratos (%)**	80,75 ± 0,13 <sup>a</sup>	26,92	72,53 ± 0,10 <sup>b</sup>	24,18	66,19
Proteínas (%)**	9,03 ± 0,09 <sup>b</sup>	12,04	14,87 ± 0,09 <sup>a</sup>	19,83	6,44
Lipídios (%)**	8,68 ± 0,06 <sup>b</sup>	15,62	10,50 ± 0,03 <sup>a</sup>	18,90	2,63
Fibra bruta (%)**	1,66 ± 0,04 <sup>b</sup>	ND	2,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	ND	0,00

\*VD: nutrientes avaliados pela média da *Dietary Reference Intakes* (DRI)<sup>16</sup>, com base em uma dieta de 2.000 kcal, 60% de carboidratos, 15% de proteínas e 25% de lipídios.

\*\*letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de t de *student* ( $p < 0,05$ ).

\*\*\*valores de nutrientes comparados com o alimento “massa para pizza”<sup>17</sup>.

\*\*\*\*resultados calculados em base seca.

FP: padrão; F2: 5,0% de FL; DP: desvio padrão da média; ND: não disponível.

FL (F2) para análise da composição química, já que essa formulação apresentou notas semelhantes a padrão em todos os atributos.

### Análise da composição físico-química

Na Tabela 3, observa-se a composição físico-química em 100 g de massa de pizza padrão e acrescida de 5,0% de FL (F2), porcentagem de valores diários recomendados (VD) e comparação com um produto referência.

O valor de umidade encontrado na massa de pizza padrão apresentou-se maior do que na massa de pizza acrescida de 5% de FL ( $p < 0,05$ ), sendo as duas inferiores quando comparadas à literatura<sup>17</sup>. Segundo a Resolução nº 93, de 31 de outubro de 2000, que trata do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Massa Alimentícia<sup>18</sup>, o teor de umidade final da massa alimentícia seca deve ser de no máximo 13,0%. Sendo assim, a formulação F2 está de acordo com a recomendação, sendo que FP apresentou resultado superior. Já o teor de cinzas de F2 foi maior que aquele encontrado em FP, o que pode ser explicado devido à linhaça possuir alto teor de cinzas em sua composição (18,5 g/100 g)<sup>19</sup>.

Observou-se que, na massa de pizza da amostra F2, os teores de lipídios e valor calórico foram maiores ( $p < 0,05$ ) que na formulação FP e no produto referência<sup>17</sup>, obtendo-se, dessa forma, maior valor de VD na formulação F2. Corroborando com esses dados, Oliveira et al.<sup>20</sup>, que elaboraram pães contendo 0% e 10% de farinha mista de trigo e linhaça, também verificaram que os teores de lipídios aumentaram com a adição desses ingredientes (2 e 6,66%, respectivamente). De forma semelhante, Lima<sup>15</sup> encontrou valores médios de lipídios

entre 2,24% e 2,93%, para pães adicionados de 0%, 4%, 7% e 10% de FL. Esses resultados relacionam-se ao fato de que a formulação F2 apresenta mais FL, a qual possui alto teor lipídico (12,25%), conforme a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)<sup>19</sup>. Entretanto, a maior parte desta gordura é do tipo MUFAs e PUFAs, as quais oferecem benefícios à saúde<sup>15</sup>.

Sendo assim, a formulação de massa de pizza enriquecida com FL se mostra a melhor opção de consumo, uma vez que a ingestão de linhaça apresenta teores aumentados de MUFAs e PUFAs, principalmente do tipo  $\omega$ -3.

Na dieta humana, a recomendação para ingestão de ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3,  $\omega$ -3) é 2,22 g/dia, com base em uma dieta de 2.000 kcal/dia<sup>21,22</sup>. Portanto, 100 g de massa de pizza, que é um valor aceitável para o consumo de massa, adicionada de 5,0% de FL, forneceria 3,14 g/dia, de acordo com o programa DietWin<sup>®17</sup>, de ácido C18:3 recomendado na dieta diária, o que já atinge o preconizado. Esses maiores níveis de PUFAs  $\omega$ -3 na massa de pizza trazem uma significativa contribuição para uma dieta saudável.

No que diz respeito aos carboidratos, verifica-se que o valor encontrado na massa padrão foi maior em relação à necessidade diária (VD) quando comparada com a massa acrescida de 5,0%, sendo superiores à referência da literatura pesquisada. Semelhante a este estudo, Lima<sup>15</sup> encontrou valores de carboidratos maiores na formulação padrão de pão, sendo que os valores diminuíram com a adição de FL.

Avaliando-se a quantidade de proteínas dos produtos, o valor encontrado na formulação F2 foi maior que FP, ambos superiores ao verificado na literatura<sup>17</sup>.

Segundo a Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar, um produto é considerado fonte de proteína se tiver, no mínimo, 10% da porcentagem de VD (100 g de produto)<sup>23</sup>. Portanto, tanto a formulação FP quanto a F2 podem ser consideradas boas fontes proteicas.

No que se refere aos valores de fibra bruta, a formulação F2 apresentou maior quantidade que a formulação FP ( $p < 0,05$ ), o que se deve principalmente ao alto teor de fibras presente na linhaça (33,5 g/100 g)<sup>19</sup> e na farinha de trigo integral (12,5 g/100 g)<sup>17</sup>. Ressalta-se que a adição de farinha de trigo integral e linhaça (5,0% – F2) proporcionou um aumento de 31,93% no teor de fibras da massa de pizza, em relação ao produto padrão (FP).

## CONCLUSÃO

O desenvolvimento dos produtos permitiu comprovar que a adição de até 5,0% de FL em massa de pizza foi melhor aceita pelos provadores dentre aqueles contendo este ingrediente, obtendo-se aceitação sensorial semelhante ao produto padrão.

Em geral, a adição de farinha de trigo integral e de linhaça nos produtos proporcionou aumento de nutrientes quando comparada à formulação padrão, trazendo benefícios nutricionais.

Assim sendo, a farinha de trigo integral e de linhaça podem ser consideradas ingredientes potenciais com propriedades funcionais para a adição em massa de pizza e similares, podendo ser oferecidos aos consumidores, com altas expectativas de aceitação no mercado.

## REFERÊNCIAS

1. Garcia GCB, Gambardella AMD, Frutuoso MFP. Estado nutricional e consumo alimentar de adolescentes de um centro de juventude da cidade de São Paulo. *Rev Nutr*. 2003;16(1):41-50.
2. Carvalho CMRG, Nogueira AMT, Teles JBM, Paz SMR, Sousa RML. Consumo alimentar de adolescentes matriculados em um colégio particular de Teresina, Piauí, Brasil. *Rev Nutr*. 2001;14(2):85-93.
3. Schenkel TC, Stockman NKA, Brown JN, Duncan AM. Evaluation of energy, nutrient and dietary fiber intakes of adolescent males. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(3):264-71.
4. Institute of Medicine. How should the recommended dietary allowances be revised? Food Nutrition Board. National Academy. 1994.
5. Maciel LMB, Pontes DS, Rodrigues MCP. Efeito da adição de farinha de linhaça no processamento de biscoito tipo cracker. *Rev Alim Nutr*. 2008;19(4):385-92.
6. Stringheta PC, Oliveira TT, Gomes RC, Amaral MPH, Carvalho AF, et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Rev Bras Cienc Farm*. 2007;43(2):181-94.
7. Galvão EL, Silva DCF, Silva JO, Moreira AVB, Sousa EMBD. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciênc Tecnol Alim*. 2008;28(3):551-7.
8. Giuntini EB, Lajolo FM, Menezes EW. Potencial de fibra alimentar em países ibero-americanos: alimentos, produtos e resíduos. *Arch Latinoam Nutr*. 2003;53(1):1-7.
9. Frozza J, Penteado TPS, Cavassini TA, Borges JN. Pizza enriquecida com fibras para pessoas com diverticulose. *Visão Acad*. 2002;3(2):87-94.
10. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. 3. ed. Curitiba (PR): Champagnat; 2011.
11. Moskowitz HR. Product optimization: approaches and applications. In: Macfee HJH, Thomson DMH (eds.). *Measurements of food preferences*. Londres: Blakie Academic & Professional, Chapman & Hall; 1994. p. 97-136.
12. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 2008.
13. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.
14. Silva MBL, Beraldo JC, Dematei LR. Efeito da adição de farinha de linhaça na aceitação de bolo de chocolate. *Centro Científico Conhecer. Encicl Biosf*. 2009;5(8):1-6.
15. Lima CC. Aplicação das farinhas de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) no processamento de pães com propriedades funcionais. [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 2007.
16. Institute of Medicine. DRI – Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington (DC): The National Academies Press; 2005.
17. Software de Nutrição. DietWin clínico, versão 3.0.13, 2008.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa alimentícia. *Diário Oficial [da] União*. Brasil, Brasília, DF, out. 2000.
19. Taco. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4. ed. Campinas (SP): NEPA-UNICAMP; 2011.
20. Oliveira TM, Pirozi MR, Borges JTS. Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça. *Rev Alim Nutr*. 2007;18(2):141-50.
21. Simopoulos AP, Leaf A, Salem Jr. N. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metabol*. 1999;43(2):127-30.
22. Enser M, Hallett K, Hewitt B, Fursey GAJ, Wood JD. Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. *Meat Sci*. 1996;42(4):443-58.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico à informação nutricional complementar. *Diário Oficial [da] União*. Brasil, Brasília, DF, jan 1998.

## Concentração de retinol em ovos de codorna e de galinha e sua relação com a recomendação nutricional para vitamina A

### Retinol concentration in quail and chicken boiled eggs and its correlation with the daily vitamin A intake recommendation in children

RIALA6/1495

Heryka Myrna Maia RAMALHO<sup>1\*</sup>, Keith Hellen Dias da SILVA<sup>2</sup>, Vanessa Patrícia Queiroz de MEDEIROS<sup>2</sup>, Videanny Videnov Alves dos SANTOS<sup>3</sup>, Juliana Karla Garcia RIBEIRO<sup>2</sup>, Roberto DIMENSTEIN<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia, Escola da Saúde, Universidade Potiguar – Laureate International Universities. Av. Senador Salgado Filho, 3.000, Lagoa Nova. CEP: 59072-970. E-mail: herykamyrna@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>3</sup>Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Recebido: 05.07.2011 – Aceito para publicação: 07.09.2012

#### RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar as concentrações de retinol nas gemas dos ovos cozidos de codorna e de galinha e compará-las com as recomendações nutricionais para crianças na faixa de 1 a 8 anos. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os valores médios de retinol encontrados nas gemas dos ovos cozidos de codorna e de galinha foram, respectivamente, de  $636,6 \pm 32,7$  e de  $379,1 \pm 30,8$   $\mu\text{g}/100$  g de gema. A concentração de retinol no ovo de codorna foi significativamente maior do que a do ovo de galinha ( $p < 0,0001$ ). O consumo de uma porção comestível (15 g), a qual corresponde a cinco gemas de ovo de codorna ou a uma gema de ovo de galinha, podem cobrir respectivamente cerca de 32% e 19% das recomendações nutricionais de retinol equivalente para crianças na faixa etária de 1 a 3 anos, e de 24% e 14%, respectivamente, para a faixa etária de 4 a 8 anos. Por conseguinte, ambos os ovos de codorna e de galinha podem ser considerados excelentes fontes de vitamina A.

**Palavras-chave.** gema, ovo de galinha, ovo de codorna, vitamina A, CLAE.

#### ABSTRACT

This study evaluated the concentrations of retinol in the yolks of quail and chicken boiled eggs, and they were correlated with the vitamin A intake recommendations for children aged from 1 to 8 years. The samples were analyzed by means of High Performance Liquid Chromatography. The mean values of retinol found in the yolks of the quail and chicken boiled eggs were  $636.6 \pm 32.7$  and  $379.1 \pm 30.8$   $\mu\text{g}/100$  g of yolk, respectively. The retinol concentration in quail egg was found to be significantly higher than that of chicken egg ( $p < 0.0001$ ). In addition, it was found that the consumption of a 15 g-portion of egg corresponded to five quail egg yolks or to one chicken egg yolk; then, they supplement 32% and 19% of the daily retinol recommendations for children aged from 1 to 3 years, respectively, and 24% and 14% for children aged from 4 to 8 years, respectively. Therefore, both kinds of eggs are a good source of vitamin A.

**Keywords.** yolk, chicken egg, quail egg, vitamin A, HPLC.

## INTRODUÇÃO

A vitamina A é essencial para o organismo humano por desempenhar funções no metabolismo geral de lipídios e proteínas, no ciclo visual, na modulação do sistema imunológico e na diferenciação e crescimento celular, sendo fundamental durante os períodos de grande proliferação e crescimento<sup>1</sup>.

A hipovitaminose A tem sido caracterizada como um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e leva à queratinização de epitélios, afetando os olhos e o revestimento dos tratos gastrointestinal, respiratório e do aparelho geniturinário, afetando também a integridade do sistema imune<sup>2</sup>. Sarni et al.<sup>3</sup> enfatizam que a deficiência de vitamina A é ainda a principal causa de cegueira evitável no mundo, estando também associada a 23% das mortes por doença diarreica em crianças. Essa deficiência também contribui para o aumento significativo dos índices de morbimortalidade infantis associados a processos infecciosos<sup>4</sup>.

No Brasil, vários levantamentos realizados em diferentes regiões apontam a hipovitaminose A como um problema endêmico, sobretudo da região Nordeste do país, sendo bem caracterizada em pré-escolares<sup>5,6,7,8</sup>. Segundo Fernandes et al.<sup>9</sup>, a maior vulnerabilidade dos pré-escolares a essa carência nutricional é justificada pelo rápido crescimento e desenvolvimento nessa fase da vida, com conseqüente aumento das necessidades de vitamina A, além das múltiplas doenças a que estão expostos, principalmente as infecções gastrointestinais e respiratórias, que reduzem a absorção e elevam consideravelmente a utilização biológica e a excreção desse micronutriente.

A ingestão inadequada de alimentos fonte de vitamina A é o principal fator etiológico da carência desta vitamina<sup>10</sup>. Segundo a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher<sup>11</sup>, 17,4% das crianças e 12,3% das mulheres no Brasil apresentavam níveis inadequados desse micronutriente, sendo as maiores prevalências dessa inadequação encontradas no Nordeste (19,0%) e Sudeste (21,6%) do país.

O nível de requerimento da vitamina A é baseado na quantidade absorvida necessária para manter o estado nutricional adequado. O consumo recomendado de vitamina A é a quantidade a ser consumida diariamente para garantir que indivíduos absorvam seus níveis de requerimento, mas não experimentem os efeitos prejudiciais da toxicidade<sup>9</sup>. Referência de Ingestão

Dietética (DRIs) representam o conjunto de referência de ingestão de nutrientes estabelecido e usado para o planejamento e avaliação das dietas do indivíduo ou grupos de indivíduos saudáveis, segundo estágio de vida e gênero<sup>10</sup>. De acordo com as DRIs (2001), a ingestão dietética recomendada (RDA) de retinol para crianças na faixa de 1 a 3 anos é de 340 µg/dia e de 4 a 8 anos é de 440 µg/dia.

O ovo é considerado uma importante fonte alimentar de vitamina A. Segundo Rodrigues e Salay<sup>12</sup>, trata-se de um alimento fonte de proteínas de alto valor biológico, sendo sua gema rica em vitamina A, com valores encontrados na literatura que variam entre 374 µg/100 g gema e 810 µg/100 g gema, em ovos de codorna e de galinha, respectivamente.

Sabendo-se da aceitação do ovo pelo público infantil e de sua importância como fonte de vitamina A, este estudo teve o objetivo de avaliar os níveis de retinol nas gemas de ovos de codorna e de galinha, considerando serem estes os dois tipos de ovos mais consumidos pela população em geral, e compará-los com as recomendações para crianças na faixa etária de 1 a 8 anos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material biológico

Para a realização deste trabalho, foram selecionadas aleatoriamente três marcas de ovos de codorna e de galinha comercializados em Natal (RN). Para tanto, foram visitados três grandes estabelecimentos comerciais do setor, onde foram adquiridas duas cartelas de ovos de lotes diferentes, com data recente de fabricação. Os ovos de codorna e de galinha eram frescos, com peso médio de 11 g para os ovos de codorna e 60 g para os ovos de galinha, sendo o peso das gemas de 3 g e 15 g, respectivamente.

### Método

#### *Preparo das amostras*

Para ambos os tipos de ovos, codorna e galinha, foram adquiridas duas cartelas de ovos de lotes diferentes em cada estabelecimento comercial, totalizando seis cartelas de cada marca analisada. De cada uma delas, meia dúzia de ovos foi separada e cozida por dez minutos a 100 °C. Posteriormente, as gemas foram separadas e pesadas. A estas, foi adicionada quantidade equivalente ao seu peso de solução salina a 0,9% e, em seguida, foram

homogeneizadas com um mix triturador, formando assim um homogenado de gema a 50%, do qual se tomaram 10 alíquotas de 2 g para análise nas etapas seguintes.

#### *Saponificação e extração de retinol das amostras*

A extração do retinol da gema dos ovos foi feita baseada no método de Bragagnolo e Rodriguez-Amaya<sup>13</sup>, adaptado de acordo com as condições laboratoriais. Foram pesados 2 g de homogenado em tubos de polipropileno com tampa rosqueável de 15 mL, envoltos com papel alumínio para impedir a degradação da vitamina A pela ação da luz. Foi realizada uma saponificação alcalina com 2 mL de hidróxido de potássio a 50%, com o objetivo de hidrolisar os ésteres de retinil presentes na amostra. Ao mesmo tempo, foi adicionado 2 mL de etanol a 95% para desnaturação das proteínas. A solução foi mantida em banho-maria a 45 °C por 120 minutos. Em seguida, a extração dos lipídios da amostra foi obtida em três lavagens sucessivas, utilizando 4 mL de hexano em cada. Após a adição do solvente, as amostras foram agitadas, centrifugadas por 10 minutos (500 xg) e os sobrenadantes foram removidos e adicionados em um novo tubo. Da fase hexânica, 3 mL foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37 °C, e os extratos secos foram armazenados a -18 °C.

#### **Determinação de retinol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Para a análise cromatográfica do retinol, o extrato seco foi redissolvido em 1 mL de etanol com grau de pureza para CLAE e agitado por um minuto. A concentração do retinol das amostras foi determinada com o auxílio de um Cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e Integrador Cromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna C18 LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6 mm × 25 cm × 5 µm. A fase móvel utilizada foi metanol 100%, com fluxo de 1 mL/min.

A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com os tempos de retenção e as áreas dos respectivos padrões. A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico ( $\epsilon$  1%, 1 cm = 1.780) em etanol absoluto e comprimento de onda de 325 nm<sup>14</sup>.

A validação do método foi conseguida por meio da realização de testes de recuperação, linearidade e de repetitividade, com a finalidade de verificar a exatidão, linearidade e precisão do método.

Para a quantificação do retinol, foram estabelecidas curvas de calibração periodicamente

no decorrer do período experimental. Inicialmente, foi preparado um padrão estoque de retinol (Sigma  $\geq$  95%); em seguida, foram realizadas diluições, até que se chegasse a um padrão de concentração desejada. A partir deste último, foram feitos os padrões para a curva de calibração – portanto, a linearidade do método foi testada utilizando-se cinco níveis de concentração, que variaram de 0,1 a 1,6 µg/mL. O coeficiente de linearidade das curvas foi sempre superior a 0,9997, resultado que indica uma ótima linearidade do método.

O teste de recuperação foi realizado com amostras de ovos de codorna. Para tanto, foram retiradas quatro alíquotas; em três dessas alíquotas, foram acrescidas uma concentração conhecida de retinol padrão (Sigma). Todas as alíquotas foram submetidas ao processo extrativo, como descrito anteriormente. Após a finalização desse processo, a concentração de retinol nas amostras foi determinada por CLAE. Foram obtidas recuperações para o retinol adicionado nas amostras na faixa de 104,0-108,0%. Esses resultados indicam que a metodologia utilizada tem uma exatidão confiável.

Nos testes de repetitividade e precisão intermediária, foram utilizadas três alíquotas de uma amostra de gema de ovos de codorna. Essas amostras passaram pelo processo extrativo e foram armazenadas secas e congeladas para posterior determinação de retinol. A aplicação em CLAE das amostras ocorreu em três dias não consecutivos. Os valores dos coeficientes de variação obtidos das alíquotas encontrados após a cromatografia foram entre 1,23% e 1,93%. Portanto, esses valores indicam uma precisão aceitável para a validação de um método analítico.

Os limites de detecção e quantificação foram baseados na linearidade da curva padrão, obtendo-se valores de 0,05 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente.

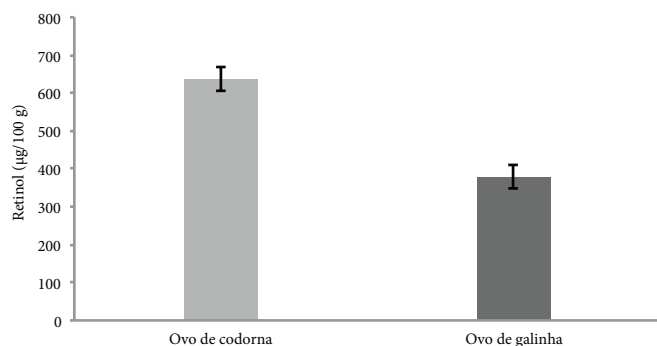
#### **Análise estatística**

As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por meio do teste *t* de Student, utilizando o programa Statistica 99 Edition (Copyright© 1984-1999 by StatSoft, Inc.), e foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

#### **RESULTADOS**

O valor médio de retinol nos ovos de codorna analisados neste estudo foi  $636,6 \pm 32,7$  µg/100 g de gema, ao passo que, nos ovos de galinha, a média de

retinol foi  $379,1 \pm 30,8 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  de gema. Sendo assim, a diferença entre o teor médio de retinol dos ovos de codorna e galinha cozidos foi de cerca de 41%. Essa diferença pode ser considerada altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1).



\* Estatisticamente diferente da média de ovo de galinha ( $p < 0,0001$ )  
**Figura 1.** Níveis de retinol em ovos de codorna e de galinha ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )

De acordo com os níveis de retinol demonstrados na análise deste estudo, e levando-se em conta a RDA para crianças – 300 e 400  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de retinol para crianças de 1 a 3 anos e 4 a 8 anos, respectivamente, verificou-se que o consumo de uma porção comestível (15 g), correspondendo a cinco gemas de ovo de codorna ou uma gema de ovo de galinha, podem cobrir em torno de 32% e 19%, respectivamente, das recomendações diárias de retinol para crianças na faixa etária de 1 a 3 anos, e 24% e 14%, respectivamente, para crianças na faixa etária de 4 a 8 anos. A porção comestível dos ovos de codorna e de galinha oferecem 11% e 6%, respectivamente, da recomendação diária de retinol para homens adultos, cuja RDA corresponde a 900  $\mu\text{g}/\text{dia}$ . Com relação às mulheres, esses ovos podem oferecer 14% e 8%, respectivamente, das suas necessidades nutricionais, ao tomar como referência a RDA de 700  $\mu\text{g}/\text{dia}$  para esse grupo.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram níveis de retinol na gema do ovo de codorna superiores aos encontrados por Bardos et al.<sup>15</sup> e Karadas et al.<sup>16</sup>, os quais analisaram os níveis de retinol na gema de ovos de codorna, verificando uma concentração de 374  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de gema e 438  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de gema, respectivamente. Ramalho et al.<sup>17</sup>, ao analisar os níveis de retinol em ovos de codorna na mesma localidade do presente trabalho, verificou um nível médio de 604  $\mu\text{g}/100$

g de gema, valores estes semelhantes aos encontrados neste trabalho. Por outro lado, Marques et al.<sup>18</sup>, ao analisar níveis de retinol em ovos de codorna no Sudeste do país, verificaram uma concentração média de 805,0  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  gema. Essas diferenças nos níveis de retinol observadas podem ser justificadas por diferentes fatores, sendo alguns destes: a origem dos ovos, as diferenças climáticas entre os países e a alimentação das aves.

Surai et al.<sup>19</sup> analisaram o nível de retinol nas gemas de ovos de galinha, determinando uma concentração de 401  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ , resultado este maior que o encontrado neste trabalho. Ollilainen et al.<sup>20</sup>, Squires et al.<sup>21</sup> e Mendonça et al.<sup>22</sup>, por sua vez, encontraram 764,7, 810,0 e 700,2  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  gema, respectivamente, valores estes superiores ao encontrado pelo presente estudo.

Ao comparar os valores de retinol em ovos com os de outros alimentos de origem animal como o leite, também bastante consumido pela população em geral, observa-se que o primeiro apresenta níveis de retinol elevados, evidenciando seu importante papel como fonte de vitamina A. Em estudo realizado por Verruma e Salgado<sup>23</sup>, o leite de vaca apresentou 56  $\mu\text{g}$  de retinol/100 mL de leite e o de búfala, 61  $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ .

Ao se avaliar a importância desse alimento para os indivíduos, deve-se considerar a ingestão dietética recomendada (RDA), que significa o nível de ingestão dietética diária, suficiente para atender as necessidades nutricionais de 97% a 98% dos indivíduos saudáveis de um determinado grupo de mesmo gênero e estágio de vida. Os requerimentos são relativamente mais altos nas etapas iniciais da vida, devido principalmente às maiores necessidades de crescimento, que são superiores às de manutenção<sup>24,25</sup>.

Segundo Souza e Vilas Boas<sup>26</sup>, o incentivo ao consumo de alimentos fonte de vitamina A é uma das medidas para prevenção da hipovitaminose A. Diante dos resultados do nosso estudo, com relevante aporte de vitamina A, fica evidente a contribuição do ovo como fonte desse micronutriente, principalmente num país como o Brasil, em que os pré-escolares têm sido relatados como o principal grupo atingido por essa carência, sendo fundamental o incentivo ao consumo do ovo como uma estratégia de intervenção no combate à hipovitaminose A. Além disso, a adequação no consumo de vitamina A em crianças pode garantir crescimento e desenvolvimento saudável e auxiliar na proteção contra as infecções de maior impacto sobre a saúde e sobrevivência infantis.

## CONCLUSÃO

Os ovos de codorna e de galinha são excelentes fontes de vitamina A, sendo que os de codorna apresentam maior concentração de retinol por 100 g de gema. A concentração de retinol nos ovos de codorna e de galinha encontradas no presente trabalho podem contribuir com até 32% das recomendações diárias de retinol para crianças na faixa etária de 1 a 3 anos, e até 24% para crianças na faixa etária de 4 a 8 anos. Assim, o consumo de ovos configura-se numa excelente alternativa no combate e prevenção da hipovitaminose A.

## REFERÊNCIAS

1. Dimenstein R, Nascimento THCR, Melo ILP, Ribeiro KDS. Avaliação dos níveis de retinol no colostro humano e sua relação com o estado nutricional materno em vitamina A. *Rev Bras Med*. 2006;65(5):206-10.
2. Geraldo RRC, Paiva SAR, Pitas AMCS, Godoy I, Campana AO. Distribuição da hipovitaminose A no Brasil nas últimas quatro décadas: ingestão alimentar, sinais clínicos e dados bioquímicos. *Rev Nutr*. 2003;16(4):443-60.
3. Sarni RS, Kochi C, Ramalho RA, Schoeps DO, Sato K, Mattoso LCQ, et al. Vitamina A: nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48(1):48-53.
4. McLaren DS, Frigg M. Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A (VADD). Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud; 1999.
5. Santos MA, Rezende EG, Lamounier JA, Galvão MAM, Bonomo E, Leite RC. Hipovitaminose A em escolares da zona rural de Minas Gerais. *Rev Nutr*. 2005;18(3):331-9.
6. Dimenstein R, Albuquerque EM, Fernandes LL, Lourenço RMS. Prevalência de Hipovitaminose A em puérperas da Maternidade Escola Januário Cicco – Natal/RN. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim*. 2006;31(3):37-45.
7. Lopes RE, Ramos KS, Bressani CC, Arruda IK, Souza AI. Prevalência de anemia e hipovitaminose A em puérperas do Centro de Atenção à Mulher do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP: um estudo piloto. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2006;6(1):S63-S68.
8. Dantas JCO, Medeiros ACP, Rodrigues KDSR, Dimenstein R. Concentração sérica de retinol e prevalência de deficiência de vitamina A em puérperas. *Rev Bras Prom Saúde*. 2011;24(1):40-5.
9. Fernandes TFS, Diniz AS, Cabral PC, Oliveira RS, Lóla MMF, Silva SMM, et al. Hipovitaminose A em pré-escolares de creches públicas do Recife: indicadores bioquímico e dietético. *Rev Nutr*. 2005;18(4):471-80.
10. Dolinsky M, Ramalho A. de Deficiência vitamina A: uma revisão atualizada. *Rev Compacta – Temas Nutr Aliment On-Line*. 2003;4(2):7-18. [acesso 2004 dez 5]. [Disponível em <http://www.pnut.epm.br/compacta.htm>.]
11. Ministério da Saúde (BR). Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS-2006). [acesso 2012 mar 22]. [Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pnds/anemia.php>.]
12. Rodrigues KRM, Salay E. Atitudes de granjeiros, atacadistas, varejistas e consumidores em relação à qualidade sanitária do ovo de galinha *in natura*. *Rev Nutr*. 2001;14(3):185-93.
13. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *J Food Comp Anal*. 2003;16(2):147-53.
14. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentration of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 1992;56(2):417-26.
15. Bardos L, Soter G, Karchesz K. Effect of retinyl acetate, ascorbic acid and tocopherol supplementation of the feed on egg vitamin A content in japonese quail. *Acta Veter Hung*. 1996;44(2):213-9.
16. Karadas F, Surai PF, Sparks NHC, Grammenids E. Effects of maternal dietary supplementation with three sources of carotenoids on the retinyl esters of egg yolk and developing quail liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2005;41(2):244-51.
17. Ramalho HMM, Silva KHD, Santos VVA, Cavalcanti JS, Dimenstein, R. Effect of retinyl palmitate supplementation on egg yolk retinol and cholesterol concentrations in quail. *Braz Poult Sci*. 2008;49(4):475-81.
18. Marques RH, Gravena RA, Silva JDT, Roccon J, Picarelli J, Hada FH, et al. Effect of supplementation of diets for quails with vitamins A, D and E on performance of the birds and quality and enrichment of eggs. *Rev Bras Zootec*. 2011;40(6):1222-32.
19. Surai PF, Ionov IA, Kuklenko TV, Kostjuk IA, Acpherson AM, Speake BK, et al. Effect of supplementing the hen's diet with vitamin A on the accumulation of vitamins A and E, ascorbic acid and carotenoids in the egg yolk and in the embryonic liver. *Braz Poult Sci*. 1998;39(2):257-63.
20. Ollilainen V, Heinonen M, Linkola E, Varo P, Koivistoinen P. Carotenoids and retinoids in Finnish foods: dairy products and eggs. *J Dairy Sci*. 1989;72(9):2257-65.
21. Squires MW, Naber EC. Vitamin profiles of eggs as indicators of nutritional status in the laying hen: riboflavin study. *Poultry Sci*. 1993;72(3):483-94.
22. Mendonça CX, Almeida CRM, Mori AV, Watanabe C. Effect of Dietary Vitamin A on Egg Yolk Retinol and Tocopherol Levels. *J Appl Poult Res*. 2002;11(4):373-8.
23. Verruma MR, Salgado JM. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci Agric*. 1994;51(1):131-7.
24. Mahan LK, Escott-Stump, S. In: KRAUSE: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 10. ed. São Paulo (SP): Roca; 2002.
25. McLaren DS, Frigg M. Guía de Sight and Life sobre la Vitamina A en los Estados de Salud y Enfermedad. 2. ed. 2002. [Disponível em: <http://www.sightandlife.org/booksSALpdf/GBspan.pdf>.]
26. Souza WA, Vilas Boas OMG. A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;12(3):173-9.

# Influência do uso de cultura adjunta nas características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo Camembert

## Effect of the addition of a supplementary culture on the physical-chemical and sensory characteristics of Camembert-type cheese

RIALA6/1496

Geruza DIAS, Guilherme Miranda TAVARES, Antônio Fernandes de CARVALHO, Mauro Mansur FURTADO\*

\*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa, MG, CEP: 36570-000. Tel. (31) 3899-1843. E-mail: mmansur@ufv.br

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Registro: 50704155828

Recebido: 01.12.2012 – Aceito para publicação: 03.07.2012

### RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da adição do *Geotrichum candidum*, como cultura adjunta, na aceitação e composição do queijo tipo Camembert. O leite utilizado na fabricação dos queijos foi submetido à pasteurização e adicionado de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Foram realizados quatro tratamentos: controle (T1) – sem adição de *Geotrichum candidum*; e T2, T3 e T4, com concentrações, respectivamente, de 0,5 U, 1 U e 1,5 U do microorganismo. Após 1, 9, 17, 25, 33 e 41 dias de fabricação, os queijos foram avaliados quanto aos parâmetros: acidez, pH, proteína, NS a pH 4,6, NS em TCA 12%, umidade, e para gordura e sal no queijo com um dia de preparação. A análise de aceitação foi realizada aos 30 dias de maturação. Os queijos com e sem adição de *Geotrichum candidum* não diferiram ( $P > 0,05$ ) nas análises físico-químicas. Os quatro tratamentos diferiram ( $P < 0,05$ ) em todas as análises no decorrer do tempo de maturação. Com o aumento na concentração do *Geotrichum candidum*, houve aumento na média de aceitação dos provadores. A utilização do *Geotrichum candidum* é uma boa alternativa para as indústrias que desejam um produto com boa aceitabilidade e características semelhantes ao tradicional queijo Camembert.

**Palavras-chave.** queijo camembert, *Geotrichum candidum*, maturação, aceitação.

### ABSTRACT

This study evaluated the effect of *Geotrichum candidum* addition as an adjunct culture on the acceptance and composition of Camembert-type cheese. The milk used for cheese manufacturing was pasteurized and supplemented with *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Four treatments were performed: control (T1) – without adding *Geotrichum candidum*; T2-T3-T4: containing microorganisms at concentrations of 0.5 U, 1 U and 1.5 U, respectively. After 1, 9, 17, 25, 33 and 41 days of manufacture, the cheese samples were analyzed on the following parameters: acidity, pH, protein, soluble nitrogen at pH 4.6, TCA 12 % soluble nitrogen, and moisture, and fat and salt contents in cheese after 1-day production. Sensory analysis was performed after 30 days of maturing. No significant difference was found in the physical-chemical analysis in cheeses produced with and without adding *Geotrichum candidum* ( $P > 0.05$ ). However, significant differences ( $P < 0.05$ ) were detected in all of the analyses throughout the maturing period. The acceptance of cheese by tasters increased with the rise of *Geotrichum candidum* concentration added into the cheese. The use of *Geotrichum candidum* is a valuable alternative for industries seeking for a product with favorable acceptability and with characteristics similar to the traditional Camembert-type cheese.

**Keywords.** camembert cheese, *Geotrichum candidum*, ripening, acceptance.



## INTRODUÇÃO

O queijo Camembert, de origem francesa, foi fabricado pela primeira vez, artesanalmente, em 1791. Produzido em diversos países, é considerado um dos queijos mais famosos do mundo. Caracteriza-se pelo crescimento externo do mofo branco *Penicillium candidum* e apresenta massa mole, com sabor e aroma pronunciados<sup>1</sup>.

Na França, berço do Camembert e de outros queijos maturados por fungos, é bastante comum a utilização de outros cultivos à base de fungos e leveduras<sup>1</sup>. Estes são cultivos que, além de propiciar sabor e aroma distintos ao Camembert, modificam o meio, favorecendo e, ao mesmo tempo, controlando o crescimento do *Penicillium candidum*<sup>2</sup>.

De acordo com Drake et al.<sup>3</sup>, culturas adjuntas podem melhorar ou acelerar o desenvolvimento do sabor dos queijos, por meio do aumento da proteólise secundária. Em geral, a adição dessas culturas resulta no aumento da atividade aminopeptidase, que é responsável pela redução do gosto amargo e pelo aumento na concentração de peptídeos de sabor desejável e precursores de sabores.

Os micro-organismos mais utilizados, como adjuntos de maturação, na fabricação do *Camembert* são o *Geotrichum candidum* e algumas leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Cândida* ou *Debaryomyces*<sup>4</sup>. O *Geotrichum candidum* possui muitas rotas metabólicas diferentes, que são de interesse particular à indústria de laticínios, contribuindo diretamente para maturação e formação de sabor nos queijos. Devido a seus diversos metabólitos, esse micro-organismo realiza papel importante no processo de maturação de muitos queijos macios e semiduros, podendo apresentar uma contribuição positiva ao desenvolvimento de sabor e aroma<sup>3</sup>. Segundo Molimard et al.<sup>5</sup>, *Geotrichum candidum* é um importante componente presente na microbiota de queijos macios como Camembert e queijos de leite de ovelha fabricados com leite cru. Entretanto, esse micro-organismo raramente é encontrado em queijos de leite pasteurizado<sup>6</sup>.

Dessa forma, julga-se interessante o uso desse micro-organismo em fabricações a partir de leite pasteurizado, para obtenção de queijos com propriedades sensoriais semelhantes àqueles fabricados com leite cru<sup>7</sup>. Estudos adicionais de interações com leveduras e bactérias na fabricação e maturação de queijo são necessários a fim de facilitar a inovação e melhoramento de produtos<sup>8</sup>. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de *Geotrichum candidum* como cultura adjunta no queijo

tipo Camembert, avaliando as implicações decorrentes da sua adição nas características físico-químicas e sensoriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

As fabricações e análises dos queijos tipo Camembert foram realizadas na Usina Piloto de Laticínios Funarbe e no Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos, respectivamente, situados no campus da Universidade Federal de Viçosa. O *Geotrichum candidum* foi fornecido pela Chr. Hansen, código GEO CD1, recomendado para produção de queijos mofados tipo Camembert.

### Produção do queijo tipo Camembert

O queijo tipo Camembert foi fabricado de acordo com a metodologia sugerida por Furtado<sup>1</sup>. Em todos os tratamentos, o leite foi padronizado quanto ao teor de gordura (3,0%), submetido à pasteurização lenta (65 °C/30 minutos, fermentado com fermento láctico composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a 1% até acidez de 20 °Dornic). Foram realizados quatro tratamentos: controle (T1) – sem adição de *Geotrichum candidum*; e T2, T3 e T4 com concentrações de 0,5 U, 1 U e 1,5 U do micro-organismo, respectivamente. A embalagem da cultura composta por 10 U corresponde a 30 mL de solução.

Foi adicionado em todos os tratamentos o cloreto de cálcio e coalho, permitindo-se a coagulação e, posteriormente, realizou-se o corte, mexedura, enformagem, acidificação da massa e salga. Os queijos foram salgados em salmoura com 20% de sal à temperatura de 10 °C e acidificada com ácido clorídrico a um pH próximo ao do queijo, na faixa de 4,7-4,8. O tempo de salga foi de 50 minutos para todos os tratamentos. Logo após a saída da salmoura, os queijos foram submetidos à aplicação de *Penicillium candidum*. Após o crescimento do fungo (7 dias após fabricação), os queijos foram embalados em papel alumínio e mantidos à temperatura de 8 °C até completa maturação.

Cada formulação foi conduzida em condições iguais e repetida três vezes ao longo do projeto. Os queijos foram maturados durante um período de 41 dias, sendo as análises realizadas com 1, 9, 17, 25, 33 e 41 dias de fabricação.

### Análises físico-químicas do leite pasteurizado

A determinação de acidez titulável, gordura, densidade e crioscopia foi realizada segundo a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006<sup>9</sup>.

### **Análises físico-químicas do queijo tipo Camembert com um dia de fabricação**

As determinações de gordura e sal foram realizadas por metodologia recomendada pela Instrução Normativa nº 68 do Ministério da Agricultura<sup>9</sup>, e proteína total foi determinada pelo método Kjeldhal<sup>10</sup>.

### **Análises físico-químicas do queijo tipo Camembert durante o período de maturação**

Os parâmetros físico-químicos analisados foram: determinação do teor de umidade – de acordo com International Dairy Federation Standard<sup>10</sup>; determinação do pH pelo método potenciométrico<sup>10</sup>; atividade de água – utilizando medidor digital Aqualab modelo CX2T – Decagon Devices; determinação de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12% – foram determinados pelo método Kjeldhal, segundo a técnica descrita pela International Dairy Federation<sup>10</sup>; e determinação dos índices de extensão de maturação e profundidade de maturação – foram determinados de acordo com Wolfschoon-Pombo<sup>11</sup>.

### **Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em parcelas subdivididas, tendo nas parcelas quatro tratamentos: T1 controle (sem adição do *Geotrichum candidum*) e T2, T3 e T4, e na sub-parcela os níveis do período de maturação (1, 9, 17, 25, 33, 41 dias) de fabricação. Para cada um dos quatro tratamentos, foram executadas três repetições do queijo tipo Camembert. Cada unidade experimental foi representada por um tanque de fabricação de queijo, sendo todas as análises realizadas em duplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System)<sup>12</sup>, versão 9.2, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

### **Avaliação sensorial**

Os queijos foram submetidos ao teste de aceitação 30 dias após a fabricação, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos. Esse projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa, processo 50704155828, cumprindo com os requisitos necessários para sua publicação.

Apresentou-se para 50 consumidores, em cabines individuais, as amostras contendo aproximadamente 30 g de queijo de cada tratamento à temperatura de 20 °C, devidamente codificadas com números de três dígitos e

servidas de modo aleatório. Um copo de água filtrada e uma uva foram fornecidos aos provadores para enxaguar a boca e diminuir a interferência entre as amostras.

Cada provador recebeu uma ficha de avaliação para cada amostra. Foi solicitado que indicassem, na escala hedônica de 9 pontos, o seu julgamento em relação à aceitação do produto, sendo atribuído nota 9 para “gostei extremamente” e 1 para “desgostei extremamente”<sup>13</sup>.

Os resultados foram submetidos ao delineamento em blocos casualizados (DBC), utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System)<sup>12</sup> versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análises do leite pasteurizado utilizado na fabricação dos queijos**

O leite pasteurizado utilizado na fabricação dos queijos tipo Camembert apresentou composição físico-química dentro da faixa considerada aceitável de acordo com a Instrução Normativa nº 62, de 11 de dezembro de 2011<sup>14</sup>, não apresentando variações entre as produções.

A média do teor de gordura do leite para fabricação do queijo tipo Camembert foi de 3,07%.

Segundo Furtado<sup>1</sup>, na prática é comum a padronização do leite para 2,7-3,0% de gordura. Pode-se considerar, com os dados obtidos, que os valores médios de crioscopia encontrados no leite pasteurizado utilizado para fabricação dos queijos tipo Camembert estão de acordo com os padrões exigidos para leite pasteurizado<sup>14</sup>.

### **Análises físico-químicas do queijo tipo Camembert com um dia de fabricação**

Os teores de gordura dos quatro tratamentos foram de aproximadamente 24%, estando de acordo com o encontrado por Voigt et al.<sup>15</sup>, não apresentando grandes variações entre os tratamentos. Os resultados do teor de sal do queijo tipo Camembert T1 controle (1,28%) encontrou-se próximo àqueles dos queijos com *Geotrichum candidum*, com T2 (1,15%), T3 (1,22%), e T4 (1,18%), já que foram fabricados utilizando salmoura com um mesmo teor de sal e o mesmo tempo de salga. Porém, estão abaixo do teor encontrado por Voigt et al.<sup>15</sup>. Devido ao fato do *Geotrichum candidum* ser muito sensível ao sal, produziu-se um queijo tipo Camembert com teor de sal na faixa de 1,15 a 1,30%, inferior ao indicado

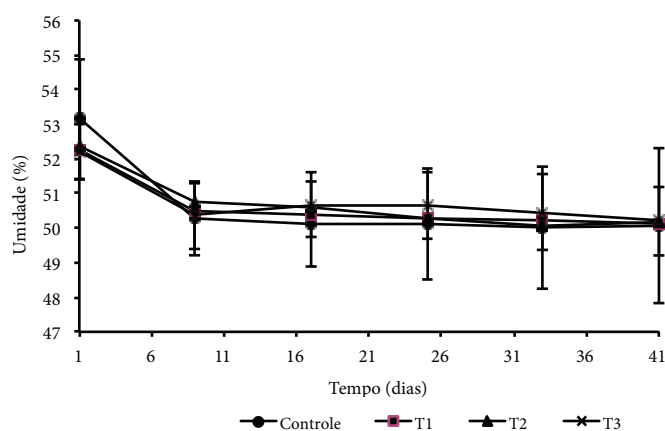
por Furtado<sup>1</sup>, que está na faixa de 2,00 a 2,50%, porém, mantendo as características do sabor típico do queijo Camembert. Segundo o mesmo autor, o teor ideal de sal para o crescimento de *Geotrichum candidum* é de 0,5%, e qualquer teor superior passa a inibi-lo gradativamente.

Os valores médios dos teores de proteína dos quatro tratamentos apresentaram-se dentro dos teores normais de aproximadamente 18%<sup>1</sup>, não apresentando grandes variações entre os tratamentos, como esperado. De todos os compostos presentes na massa do queijo, a proteína é a responsável pela elasticidade, textura e formação de compostos que caracterizam o flavor e o aroma do queijo após a proteólise<sup>16</sup>.

### Avaliação físico-química durante o período de maturação

#### Umidade

Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos com relação à umidade das amostras (Figura 1). Apesar de serem encontradas pequenas variações nas amostras submetidas aos tratamentos, que apresentaram umidade reduzida nos primeiros dias de fabricação em relação à amostra controle, essas diferenças não caracterizam alterações marcantes na umidade do queijo e nem caracteriza o queijo como fora dos padrões. Os resultados encontrados na umidade do queijo tipo Camembert (51% a 52%, com um dia de fabricação) estão dentro do padrão estabelecido por Walstra et al.<sup>4</sup> para o queijo Camembert.



**Figura 1.** Evolução do teor de umidade dos queijos durante o tempo de maturação para os quatro tratamentos

Segundo Furtado<sup>1</sup>, o queijo tipo Camembert deve apresentar um teor de umidade médio de 50%

após 30 dias da fabricação, o que foi observado nos resultados encontrados. A perda de umidade observada nos primeiros dias de fabricação está relacionada ao fato do queijo não estar ainda embalado, perdendo água por evaporação. Após sua embalagem em papel alumínio, não foi observado grandes variações nos valores médios do teor de umidade nos tratamentos.

#### pH

Os dados apresentados na Figura 2 indicam a modificação do pH na casca e no meio do queijo, respectivamente, durante 41 dias de maturação. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) dos valores de pH entre os tratamentos durante todo o período de maturação. Os valores do pH do queijo estão dentro daqueles recomendados por Gripon et al.<sup>17</sup>. A Figura 2a mostra que os tratamentos com *Geotrichum candidum* causaram um aumento no pH da casca do queijo nos primeiros dias de fabricação comparado com o tratamento controle, estando em consonância com Fox<sup>18</sup>.

Segundo Farkye e Fox<sup>19</sup>, durante a maturação, o pH do queijo aumenta devido à formação de compostos nitrogenados alcalinos ou devido ao metabolismo do ácido láctico. De acordo com os mesmos autores, o pH do Camembert aumenta de 4,8 para 7,5 na casca do queijo após 60 dias de maturação. Pode-se verificar (Figura 2b) que, no período de 41 dias de maturação, houve a evolução esperada no pH dos queijos. Todas as médias dos valores de pH na casca do queijo, após 41 dias de maturação, estão próximas de 7,0, demonstrando que, em todos os tratamentos, observou-se uma boa capacidade proteolítica, com liberação de compostos aminados, que tendem a neutralizar a acidez natural da massa do queijo.

#### Atividade de água

De acordo com as análises, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as médias da atividade de água ( $A_w$ ) entre os quatro tratamentos durante o período de maturação (Figura 3). Observou-se diminuição ( $P < 0,05$ ) da  $A_w$  durante o período de maturação do queijo para os diferentes tratamentos, ocorrida provavelmente pelas reações proteolíticas que contribuíram para o aumento dos grupamentos iônicos capazes de fixar água<sup>20</sup>. A  $A_w$  do queijo é influenciada basicamente por três elementos: (i) teor de umidade do queijo, quanto mais alto o teor de umidade, mais alta a  $A_w$  (mantendo-se fixo o teor de sal no queijo); (ii) teor de sal no queijo, é o elemento mais importante devido ao baixo peso molecular do sal e sua alta

solubilidade; e (iii) índice de maturação do queijo, expresso pela profundidade da maturação, ou seja, a relação NPN/NT (Nitrogênio não proteico/nitrogênio total)<sup>21</sup>. A fração NPN é constituída em grande parte por aminoácidos, muitos dos quais de cadeias laterais com grupos polares ou ionizáveis que interagem facilmente com a água, diminuindo a *A<sub>w</sub>*. A *A<sub>w</sub>* representa um fator importante para o crescimento dos micro-organismos e influencia as reações enzimáticas que ocorrem no queijo durante a maturação<sup>22</sup>.

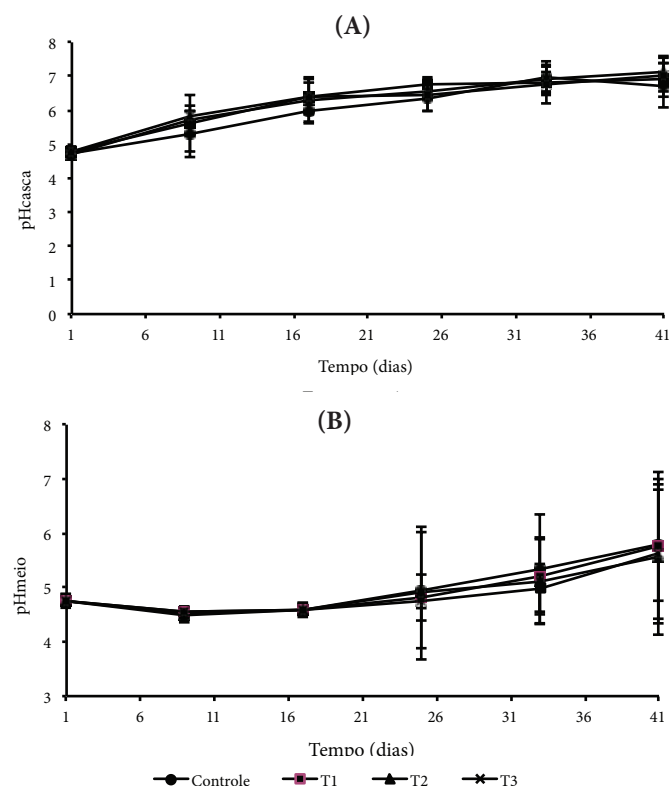


Figura 2. Médias dos resultados dos valores de pH da casca (A) e do meio (B) dos queijos em função do tempo de maturação

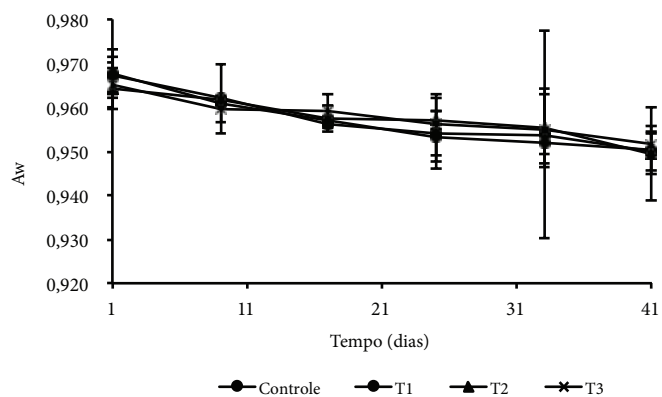


Figura 3. Médias dos resultados da atividade de água (*A<sub>w</sub>*) dos queijos em função do tempo de maturação

### Índice de extensão de maturação

A extensão da maturação é um fator indicativo da proteólise primária e ocorre principalmente pela ação proteolítica do coalho ou coagulante residual no queijo, sobre a  $\alpha$ s1-caseína e, em menor escala, sobre a  $\beta$ -caseína, dando origem a peptídeos de alto e médio peso molecular<sup>23</sup>.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as médias dos quatro tratamentos no índice de extensão de maturação. A análise de variância mostrou um efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos valores desse índice com o tempo de maturação. As curvas da evolução do índice de maturação estão representadas na Figura 4. Durante o período de estocagem, foi observado um aumento dos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6, em razão da proteólise.

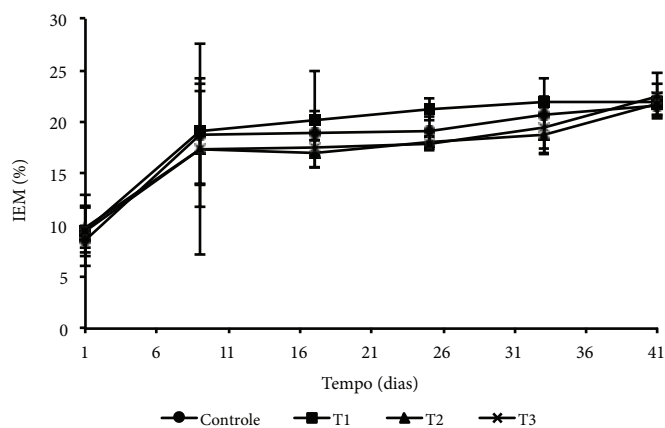


Figura 4. Médias do índice de extensão de maturação (IEM) dos queijos em função do tempo de maturação

### Índice de profundidade de maturação

O índice de profundidade de maturação está relacionado com a presença de enzimas proteolíticas oriundas de micro-organismos, que hidrolisam os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas<sup>23</sup>.

As curvas representando a evolução do índice de profundidade durante o período de maturação estão representadas na Figura 5. A análise de variância mostrou diferença ( $P < 0,05$ ) nos valores desse índice com o tempo de maturação. Ao observar essas curvas, verifica-se que ocorreu efetivamente um aumento no processo de maturação nos primeiros dias de maturação para todos os tratamentos.

Embora não tenham sido encontradas diferenças ( $P > 0,05$ ), os tratamentos com *Geotrichum candidum* tiveram valores médios de índices de profundidade de maturação mais elevados que o tratamento controle.

Esses resultados podem ser explicados pela presença de substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, principalmente em virtude da ação proteolítica das enzimas microbianas<sup>16,23</sup>. A presença do *Geotrichum candidum* pode ter contribuído para o aumento desse índice, pois, segundo Furtado<sup>1</sup>, este micro-organismo possui uma forte atividade aminopeptidásica, a qual contribui para o aumento do índice de profundidade de maturação do queijo. Esse aumento de substâncias de baixo peso molecular contribui no aroma e sabor do queijo, fato observado na análise sensorial, onde observou-se médias superiores de aceitação do queijo tipo Camembert elaborado com a utilização de maior concentração de *Geotrichum candidum*.

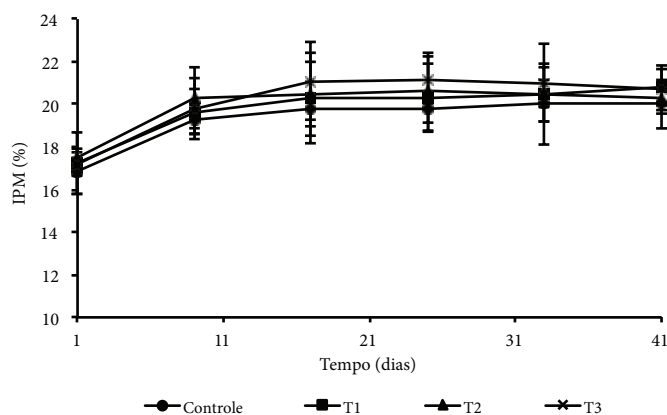


Figura 5. Médias dos índices de profundidade de maturação (IPM) dos quatro tratamentos em função do tempo de maturação

### Análise sensorial

De acordo com os dados obtidos, tanto o queijo tipo Camembert controle T1 (média 7,30) como os tratamentos T2 (média 7,76), T3 (média 7,80) e T4 (média 8,13) obtiveram notas que se encontraram na faixa de “gostei moderadamente” a “gostei extremamente”, indicando boa aceitação dos provadores. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as médias do tratamento 2 e tratamento 3, ficando entre “gostei muito” e “gostei extremamente” na escala hedônica. O tratamento 3 obteve uma média superior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento 1 e ao controle, demonstrando que houve contribuição de *Geotrichum candidum* na aceitação do queijo. As médias do tratamento 1, 2 e o controle não diferiram ao nível de 5% de probabilidade, ficando entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”. Pode-se observar nos resultados que, ao aumentar a dosagem de *Geotrichum candidum*, houve aumento da aceitação do queijo pelos provadores.

### CONCLUSÃO

Na análise sensorial, o queijo que recebeu maior dose de *Geotrichum candidum* obteve pontuação média superior ao queijo controle, demonstrando que sua adição ao leite para a fabricação do queijo tipo Camembert proporciona uma melhoria no seu sabor.

Com os dados obtidos, conclui-se que a utilização do *Geotrichum candidum* na fabricação do queijo Camembert pode ser uma boa alternativa para as indústrias que desejam um produto com boa aceitabilidade e com características semelhantes ao tradicional queijo Camembert.

### AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

### REFERÊNCIAS

1. Furtado MM. Queijos finos maturados por fungos. São Paulo (SP): Milk Bizz; 2003. p. 80-115.
2. Aziza M, Amrane A. Diauxic growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose. *Braz J Chem Eng*. 2012;29(2):203-10.
3. Drake MA, Boylston TD, Spence KD, Swanson, BG. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in cheddar cheese. *Food Res Int*. 1996;29(3-4):381-7.
4. Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. *Dairy Science and Technology*. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2006.
5. Molimard P, Lesschaeve I, Issanchou S, Brousse M, Spinnler HE. Effect of the association of surface flora on the sensory properties of mould-ripened cheese. *Le Lait*. 1997;77:181-7.
6. Welthagen JJ, Viljoen BC. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *Int J Food Microbiol*. 1999;16:63-73.
7. Mourgues R, Bergere JL, Vassal L. Possibility of improving organoleptic quality of Camembert cheese using *Geotrichum candidum*. *La Techn Lait*. 1983;978:11-5.
8. Boutrou R, Guéguen M. Interest in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int J Food Microbiol*. 2005;102:1-20.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 2006.
10. International Dairy Federation Standard. Cheese and cheese Processed Cheese. Determination of the total solids content, 4A: Bruxelas, 1982.

11. Wolfshoon-Pombo AF. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Bol Leite*. 1983;51(661):1-8.
12. SAS/STAT 9.2 User's Guide, 2 ed. Cary (NC): SAS Institute; 2009.
13. Minim VPR. Análise sensorial: Estudo com consumidores. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2006.
14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.
15. Voigt DD, Patterson MF, Linton M, Kelly AL. Effect of high-pressure treatment of milk prior to manufacture on ripening of Camembert cheese. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2011;12:1-5.
16. Eck A. O queijo, vol. 1. Coleção Euroagro. Lisboa: Europa-América; 1987.
17. Gripon JC. Mould-ripened cheeses. *In: Fox PF. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2. 3. ed. Londres: Elsevier; 2004.
18. Fox PF. (ed.). *Cheese: chemistry, physics and microbiology: major cheese groups*, vol 2. 3. ed. Londres: Elsevier; 2004.
19. Farkye NY, Fox PF. Objective indices of cheese ripening. *Trends Food Sci Technol*. 1990;11:37-40.
20. Pomar E, Prieto B, Franco I, Tornadizo ME, Fresno JM, Gonzalez J. Caracterización química y físico-química del queso Zomarano com denominacion de origen. Anais do Congresso, Porto, Portugal, maio de 2001.
21. Furtado MM. A arte e a ciência do queijo. São Paulo (SP): Globo; 1991. p. 165-9.
22. Dumais R, Blais JA, Conrad F. Queso. *In: Amiot J. Ciência e Tecnologia de La Leche*. 1991.
23. Fox PF. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1: general aspects. 3. ed. Londres: Elsevier; 2004.

## Avaliação da concentração de flúor nas águas de abastecimento público: estudo retrospectivo e de heterocontrole

### Fluoride concentration in the public water supply: the retrospective study and the external control

RIALA6/1497

Cecilia Cristina Marques dos SANTOS<sup>1\*</sup>, Júlio César da Silva RODRIGUES<sup>2</sup>, Maria do Rosário Viegata LOPES<sup>1</sup>, Rodrigo Friozi POVINELLI<sup>1</sup>, André Luiz Marçal TERRERI<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto (CLR-X), Instituto Adolfo Lutz. Rua Alberto Sufredine Bertoni, 2.325, São José do Rio Preto, SP. CEP: 15060-020. E-mail: ccmsantos@ial.sp.gov.br. Tel: (17) 3224-2602

<sup>2</sup>Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto, SP

<sup>3</sup>União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Francisco Beltrão, PR

Recebido: 30.01.2012 – Aceito para publicação: 21.08.2012

#### RESUMO

Neste estudo, foram feitas retrospectivamente três análises: (1) avaliação da concentração de flúor, na forma de fluoreto (F<sup>-</sup>), nas águas de abastecimento público de São José do Rio Preto (SJRP) (SP), de janeiro de 2003 a agosto de 2011, cuja análise foi efetuada por potenciometria com íon seletivo; (2) avaliação da concentração de flúor nas águas provenientes dos bebedouros das escolas municipais de Nova Aliança (NA) (SP), de agosto de 2010 a agosto de 2011, utilizando-se os princípios do heterocontrole; e (3) avaliação da variabilidade da fluoretação sob a óptica do benefício (máxima redução da cárie dentária) e do risco (ocorrência de fluorose dental). Os resultados obtidos apontaram que houve falhas na fluoretação. Em SJRP e em NA, respectivamente, apenas 53% e 23% das amostras apresentaram níveis de F<sup>-</sup> legalmente aceitos. Considerando-se a combinação de benefício máximo e risco baixo, enquadraram-se 56% das amostras de SJRP e 32% das amostras de NA. Este estudo apontou que os princípios do heterocontrole foram fundamentais para efetuar a identificação de falhas na fluoretação, pois, para que se tenha máxima eficiência, o nível de flúor deve manter-se no denominado “nível ótimo” e de forma ininterrupta por longos períodos. **Palavras-chave.** água de abastecimento, fluoretação, cárie dentária, vigilância sanitária, controle interno-externo, heterocontrole.

#### ABSTRACT

As a retrospective study, this investigation aimed at evaluating three issues. Firstly, to assess the fluoride rates, measured as fluorine (F<sup>-</sup>), in water samples from public water supplies of São José do Rio Preto (SJRP) (SP), from January 2003 to August 2011, by using potentiometric methodology with ion-selective, and following the guidelines established by State Legislation. Secondly, to evaluate the fluoride rates in samples from water fountains at public schools of Nova Aliança (NA) (SP), from August 2010 to August 2011, by using the guidelines of external control. The third was to evaluate the fluoridation variability by the viewpoint on the benefit (maximum reduction of tooth decays) and on the risk (occurrence of dental fluorosis). The results indicated a failure in fluoridation. In SJRP and NA only 53% and 23% of samples, respectively, showed legally permitted fluoride contents. The combination of the fluoridation maximum benefit and the low risk fitted in 56% of samples from SJRP and 32% of samples from NA. These findings indicated that the guidelines of external control were the key for identifying the fluoridation process failure, as for achieving the maximum efficiency, the fluoride level should be continuously maintained in the so-called “optimal level” for long periods. **Keywords.** water supply, fluoridation, dental caries, health surveillance, internal-external control, external control.

## INTRODUÇÃO

A fluoretação da água de abastecimento público (FAAP) é considerada o método coletivo mais eficaz de prevenção da cárie dentária, de melhor relação custo-benefício, por ser capaz de atingir todos os segmentos da população, independentemente da idade e do nível socioeconômico ou cultural<sup>1-3</sup>.

Mesmo a água fluoretada não sendo a única fonte significativa de flúor disponível, estudos continuam a mostrar que essa medida contribui em 20% na redução de cárie de esmalte em crianças<sup>4,5</sup>.

Os resultados do levantamento epidemiológico de 2003<sup>6</sup>, realizado em âmbito nacional, mostraram de uma forma geral que, até os 12 anos, as diferenças são marcantes entre municípios com e sem flúor na água. Houve uma melhor situação com relação à doença cárie para os municípios com água de abastecimento fluoretada, expressa tanto em termos do índice CPO (soma dos dentes cariados, perdidos ou obturados) quanto com relação ao percentual de crianças livres de cárie. É importante ressaltar, contudo, que este estudo não teve como objetivo verificar a eficácia da fluoretação das águas, e essas diferenças não devem ser creditadas em sua totalidade à presença de flúor na água. A prevalência de fluorose dentária em crianças de 12 anos de idade, no Brasil, em 2010, foi de 16,7%, sendo que 15,1% foram representados pelos níveis de severidade muito leve (10,8%) e leve (4,3%). Fluorose moderada foi identificada em 1,5% das crianças. O percentual de examinados com fluorose *grave* pode ser considerado nulo<sup>7</sup>. Portanto, considerando os estudos de âmbito nacional supracitados e levando em consideração os riscos e benefícios da fluoretação da água de abastecimento público, já que muitas pessoas não têm acesso a outras fontes de fluoretos, como os dentifrícios, de forma alguma se justifica a paralisação da fluoretação da água de abastecimento público visando à prevenção da fluorose dentária<sup>8</sup>.

Para que a FAAP tenha máxima eficiência, o nível de flúor deve manter-se no denominado “nível ótimo” e de forma ininterrupta por longos períodos<sup>9</sup>. Para assegurar tal condição, o controle externo da FAAP por diferentes grupos sociais (heterocontrole) faz-se necessário, uma vez que só o controle interno pode ser ineficiente, devido ao método utilizado ou à carência de pessoal devidamente treinado<sup>10-13</sup>.

Para Narvai<sup>12</sup>, o conceito de heterocontrole refere-se ao princípio segundo o qual, se um bem ou serviço qualquer implica risco ou representa fator de proteção

para a saúde pública, então, além do controle do produtor sobre o processo de produção, distribuição e consumo, deve haver controle por parte das instituições do Estado.

Vários autores<sup>14,15</sup>, e também o relatório do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Proágua) no Estado de São Paulo<sup>16,17</sup>, apontaram em seus relatos a inadequação dos teores de flúor na água de abastecimento público em municípios, o que reafirma a importância do heterocontrole. A importância do heterocontrole pode ser notada quando comparados os dados de um estudo prévio obtido por Buzalaf et al.<sup>18</sup>, com os resultados de Ramires et al.<sup>19</sup>. Este último observou uma melhoria nas condições de fluoretação da água de abastecimento no município de Bauru, onde cerca de 85% das amostras coletadas foram classificadas como aceitáveis (0,55-0,84 mg/L F<sup>-</sup>), e concluiu que a implantação do monitoramento da fluoretação da água de abastecimento por sistemas de vigilância deve ser incentivada, sendo fundamental para o controle da cárie dentária.

O Estado de São Paulo possui uma Resolução que define os teores de fluoreto nas águas de abastecimento público, considerando a variação da média da temperatura, que encontra-se na faixa de 16,4 a 33,9 °C, e assim estabelece que o teor de flúor ideal nas águas destinadas ao consumo humano é de 0,7 mg/L F<sup>-</sup> em todo o Estado de São Paulo, sendo consideradas dentro do padrão de potabilidade as águas que apresentarem teores de fluoreto na faixa de 0,6 a 0,8 mg/L F<sup>-20</sup>.

O monitoramento do teor de flúor da água para abastecimento público visa gerar conhecimentos e informações fundamentais à vigilância sanitária, em relação ao benefício e ao risco aos quais a população se expõe ao consumir essa água. Devido ao fato comprovado de que a fluoretação diminui a cárie dentária, e o excesso de flúor pode levar à fluorose dentária, é imprescindível a manutenção dos níveis de flúor de acordo com a norma legal vigente<sup>20</sup>.

Esta pesquisa teve por objetivos, por meio de um estudo retrospectivo, avaliar a concentração de flúor, medida como fluoreto (F<sup>-</sup>), por potenciometria com íon seletivo, nas águas de abastecimento público de São José do Rio Preto (SP), no período de janeiro de 2003 a agosto de 2011, de acordo com o preconizado na resolução em vigor<sup>20</sup>; avaliar a concentração de flúor nas águas provenientes dos bebedouros das escolas municipais de Nova Aliança (SP), no período de agosto de 2010 a agosto de 2011, utilizando os princípios do heterocontrole<sup>12-14</sup>; e avaliar a variabilidade da FAAP sob a óptica do benefício e risco<sup>21</sup>.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Estudo retrospectivo

Foi realizado um estudo retrospectivo baseado nos laudos emitidos pelo Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto-X (IAL CLR SJRP-X), referentes às 1.050 análises das amostras de água de abastecimento público (cavalete) do município de São José do Rio Preto, realizadas entre janeiro 2003 e agosto de 2011, e 65 amostras das águas dos bebedouros das escolas do município de Nova Aliança, no período de agosto de 2010 a agosto de 2011, sendo todas as amostras analisadas no laboratório de Físico-Química do IAL CLR SJRP-X.

Foram consideradas também informações fornecidas pelos agentes sanitários responsáveis pelas coletas das amostras, como: data da entrada da amostra (dia, mês e ano), sazonalidade e endereço da coleta da amostra (rua, bairro e região).

### Amostragem

#### *Amostras de água de abastecimento público de São José do Rio Preto*

São José do Rio Preto localiza-se na Região Sudeste do Brasil e Noroeste do Estado de São Paulo, onde a temperatura média anual é de 23,6 °C, sendo que a média das temperaturas mínimas é de 17 °C e a média das temperaturas máximas é de 30,4 °C. A população é de 408.435 habitantes (94% na zona urbana) e o município é abastecido pelo Serviço Municipal Autônomo de Água e Esgoto (SeMAE), que é o órgão responsável pelo serviço de abastecimento de água (captação, adução, tratamento, reserva e distribuição de água potável), atendendo 106 mil ligações prediais pela rede pública de distribuição, segundo o último censo demográfico (Censo 2010)<sup>22-24</sup>.

A fluoretação é feita com o flúor sob a forma de ácido fluossilícico e com bombeamento automático.

Para o estudo em pauta, as amostras de água foram coletadas em duplicata, diretamente das torneiras dos cavaletes, em frascos plásticos de 100 mL, identificados e etiquetados (coletor, ponto de coleta, local da coleta e data) e previamente enxaguados com a água da torneira. A coleta foi realizada uma vez por semana pelos técnicos do órgão de vigilância sanitária municipal, conforme cronograma estabelecido pelo Proágua.

As amostras coletadas e analisadas, no período de janeiro 2003 a agosto de 2011, foram classificadas segundo a concentração de flúor encontrada, considerando a

legislação vigente (Resolução SS 250, de 15 de agosto de 1995, da Secretária de Estado da Saúde de São Paulo), que define os teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano fornecidas por sistemas públicos de abastecimento e a variabilidade da FAAP sob a óptica do benefício e risco<sup>17,20</sup>.

#### *Amostras de água dos bebedouros das Escolas Municipais de Ensino Fundamental de Nova Aliança*

Nova Aliança localiza-se a aproximadamente 30 km de São José do Rio Preto, integrando a sua microrregião, e a temperatura média anual é de 23,4 °C, sendo que a média das temperaturas mínimas é de 16,7 °C e a média das temperaturas máximas é de 30,2 °C<sup>22</sup>. A população é de 5.891 habitantes (83% na zona urbana)<sup>24</sup>, abastecida pelo Serviço Municipal Autônomo de Água e Esgoto, e a fluoretação é feita com o flúor sob a forma de Ácido Fluossilícico e com bombeamento automático.

Para a avaliação pretendida no estudo, foram analisadas 65 amostras de água dos bebedouros de cinco Escolas Municipais de Ensino Fundamental de Nova Aliança, durante 13 meses (de agosto de 2010 a agosto de 2011), codificadas como: A, B, C, D e E.

As amostras foram coletadas em triplicata em frascos plásticos de 100 mL, identificados, etiquetados e previamente enxaguados com a própria água a ser analisada. Depois de coletadas, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Físico-Química do IAL-CRL SJRP-X.

### Dosagem de flúor

A determinação do íon fluoreto em águas, segundo preconizado no livro *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*<sup>25</sup>, normas estas editadas institucionalmente pelo Instituto Adolfo Lutz. O método potenciométrico com eletrodo íon-seletivo é o mais indicado e adequado para dosagem de concentrações acima de 0,2 mg/L de F<sup>-</sup>, devido à alta seletividade, melhor linearidade, menor susceptibilidade a interferentes, simplicidade e rapidez<sup>3,25-29</sup>. Para as condições de concentração e interferentes encontrados nas amostras de águas de abastecimento público, é recomendado o tampão TISSAB III, cuja relação entre os volumes de tampão e amostra é de 1:10, com volume final de 55 mL.

Quanto ao eletrodo combinado de íon seletivo para íon fluoreto utilizado neste estudo (Thermo Orion Íonplus), apresenta uma membrana plana (fluoreto de

lantânio) na extremidade, que toca paralelamente a superfície do líquido<sup>28</sup>.

A linearidade do método foi calculada a partir da equação da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e observando-se o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ). Segundo as instruções preconizadas pelo Inmetro<sup>30</sup>, um valor maior que 0,90 é usualmente requerido. O limite de detecção (LD) foi estudado ao nível de 0,1 mg/L de F<sup>-</sup> e apresentou coeficiente de variação de 8,9%.

A porcentagem de recuperação do íon flúor foi estimada pela análise de amostras com adição de quantidades conhecidas de padrão<sup>28</sup>.

A precisão foi determinada por meio da repetitividade, expressa como coeficiente de variação, e a exatidão foi calculada em função do erro relativo, empregando-se soluções-padrão de concentrações conhecidas<sup>26-28, 30</sup>.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

### Estudo retrospectivo

Das 1050 amostras analisadas e seus respectivos laudos emitidos no período de janeiro de 2003 a agosto de 2011, 278 (26,48%) foram reprovadas por apresentarem teor de flúor < 0,6 mg/L de F<sup>-</sup>; 212 (20,19%) por apresentarem teor de flúor > 0,8 mg/L de F<sup>-</sup>, o que resultou também em laudo condenatório. O total de 560 (53,33%) apresentou teor de flúor adequado (entre 0,6 e 0,8 mg/L de F<sup>-</sup>), estando de acordo com a legislação vigente.

A FAAP pressupõe a adição controlada e constante de teor predeterminado de flúor. Estudo colaborativo, como o publicado no "Documento de consenso técnico – classificação de águas de abastecimento público segundo o teor de flúor"<sup>21</sup>, propõe avaliar a adequação dos teores de flúor em águas, levando-se em conta, simultaneamente, o benefício e o risco, e assim observou-se que, para localidades em que as médias das temperaturas máximas se situam entre 26,3 e 32,5 °C, como na região estudada, a melhor combinação benefício-risco ocorre na faixa de 0,55 a 0,84 mg/L de F<sup>-</sup>, promovendo a máxima redução da cárie dentária com baixo risco para fluorose dental, e que, quando esse teor excede a 0,85 mg/L de F<sup>-</sup>, predispõe a população a um risco moderado e acima de 1,15 mg/L de F<sup>-</sup>, e o risco para fluorose dental passa a ser considerado alto, aliado a um benefício questionável.

Avaliando os resultados obtidos no presente estudo, consideradas as dimensões relacionadas com o

benefício de prevenir cárie e o risco de produzir fluorose, temos que, das 1.050 amostras analisadas 260 (24,77%) apresentaram concentrações de flúor que proporcionam benefício insignificante a mínimo e risco insignificante a baixo; 184 (17,52%) apresentaram fluoretação com benefício máximo porém, risco moderado; 21 (2%), benefício questionável a malefício e risco de alto a muito alto; e 585 (55,71%) apresentaram a combinação de benefício máximo e risco baixo.

Existe a necessidade de medidas de controle e heterocontrole permanentes, por meio das ações de vigilância sanitária, para garantir a homogeneidade da FAAP, uma vez que as concentrações de flúor encontradas podem promover o aparecimento da fluorose dentária<sup>31</sup>, especialmente em 2008, quando foi detectado o maior teor de flúor (1,75 mg/L de F<sup>-</sup>), e em 2009, quando ocorreu sucessão de meses com o fornecimento da água com até 1,45 mg/L de F<sup>-</sup>, enquanto nos outros anos foram observadas concentrações sem significado preventivo anticárie.

A experiência acumulada ao longo dos mais de quinze anos de ações contínuas do Proágua ainda não foi suficiente para reduzir a vulnerabilidade da população, devido à variabilidade encontrada. Há de se destacar que foram encontrados teores de flúor abaixo (< 0,6 mg/L de F<sup>-</sup>) e acima (> 0,8 mg/L de F<sup>-</sup>) do recomendado pela legislação<sup>20</sup>, em vários meses dos anos estudados.

Por outro lado, analisando a variabilidade da FAAP sob a óptica do benefício e risco, destacamos que níveis insignificantes (< 0,44 mg/L de F<sup>-</sup>) estiveram presentes em todos os anos do período estudado, situação constatada em 260 (24,77%) amostras, assim como níveis que acarretam risco moderado a muito alto (0,85 a > 1,45 mg/L de F<sup>-</sup>) em 205 (19,5%) amostras analisadas.

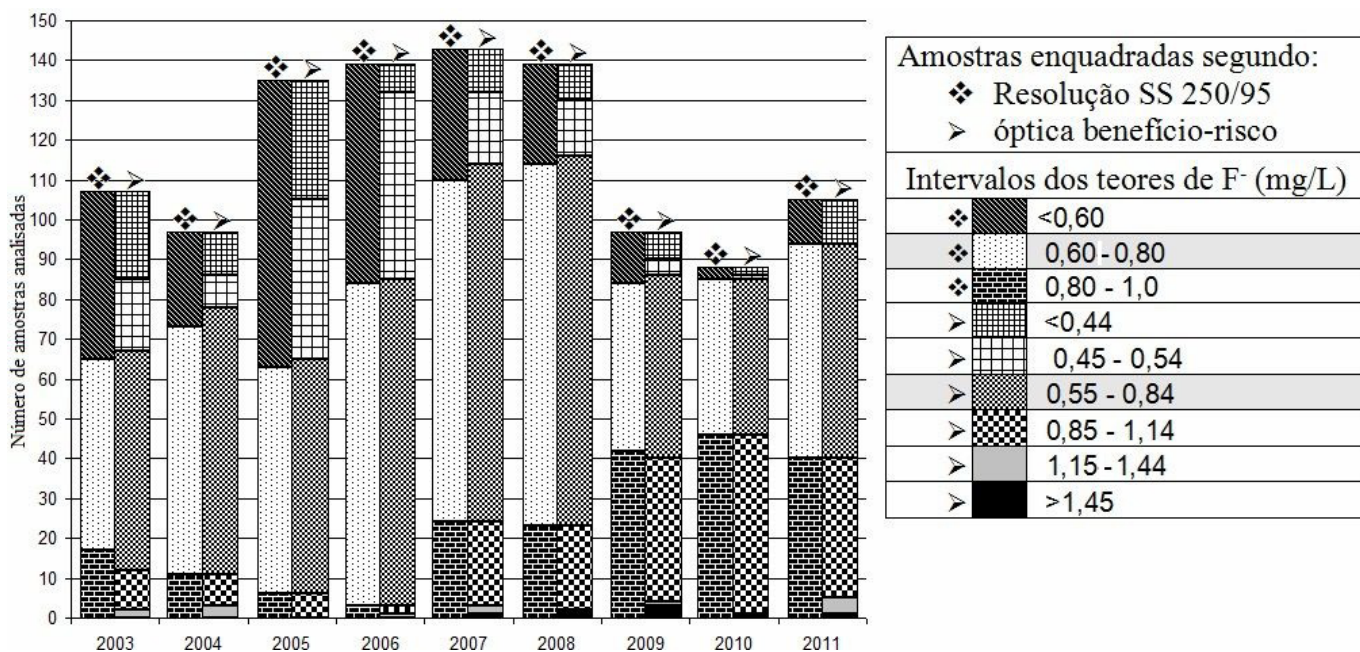
O documento que expressa o consenso técnico sobre a FAAP registra que, no universo de pelo menos 36 amostras/ano, flutuações breves e pequenas dos teores de flúor na água não comprometem seus benefícios, porém a constatação de teores de risco moderado, alto, ou muito alto requer ações de controle<sup>21</sup>.

Os resultados encontrados apontaram que os princípios do heterocontrole foram fundamentais para a identificação das possíveis falhas no processo da fluoretação, pois, para que a FAAP tenha máxima eficiência, o nível de flúor deve manter-se no denominado "nível ótimo" e de forma ininterrupta por longos períodos<sup>9</sup>.

O nível ótimo, considerando o aspecto benefício (prevenir cárie) - risco (produzir fluorose), situa-se entre 0,55 e 0,84 mg/L de F<sup>-</sup>, e, de acordo com a legislação vigente,

entre 0,6 e 0,8 mg/L de F<sup>-</sup>. Assim, das 1.050 amostras analisadas, enquadram-se nesses aspectos 585 (55,71%) e 560 (53,33%) amostras, respectivamente. As falhas na fluoretação foram reveladas por cerca de 46% das amostras,

o que deixa a população vulnerável quanto ao aspecto de saúde bucal, independentemente do enquadramento das águas, e essa situação se repetiu por vários meses consecutivos, conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Distribuição anual das amostras de água de abastecimento público de São José do Rio Preto-SP, enquadradas por níveis de flúor (mg/L de F<sup>-</sup>) de acordo com a Resolução SS 250/1995 e sob a óptica do benefício (máxima redução da cárie dentária) e risco (ocorrência de fluorose dental), no período de janeiro de 2003 a agosto 2011

### Água dos bebedouros das Escolas Municipais de Ensino Fundamental de Nova Aliança

Após 13 meses de coleta e análise da água oferecida aos alunos das cinco escolas envolvidas no projeto, os resultados analisados sob a óptica do benefício e risco revelaram que níveis insignificantes a mínimos, aliados a risco baixo (<0,54 mg/L de F<sup>-</sup>), estiveram presentes durante vários meses consecutivos, situação constatada em 28 (43,08%) amostras; níveis que proporcionam máximo benefício e risco baixo (0,55 a 0,84 mg/L de F<sup>-</sup>) ocorreram em 21 (32,31%) das amostras analisadas; e níveis que acarretam risco moderado a alto estiveram presentes em 16 (24,61%), distribuídos de maneira aleatória ao longo do período estudado.

Sob a óptica da legislação em vigor, das 65 amostras analisadas no período de agosto 2010 a agosto de 2011, 34 (52,31%) foram reprovadas por apresentarem teor de flúor < 0,6 mg/L de F<sup>-</sup>; e 16 (24,61%) por apresentarem teor de flúor > 0,8 mg/L de F<sup>-</sup>. O total de 15 (23,08%) apresentou teor de flúor adequado (entre 0,6 e 0,8 mg/L de F<sup>-</sup>).

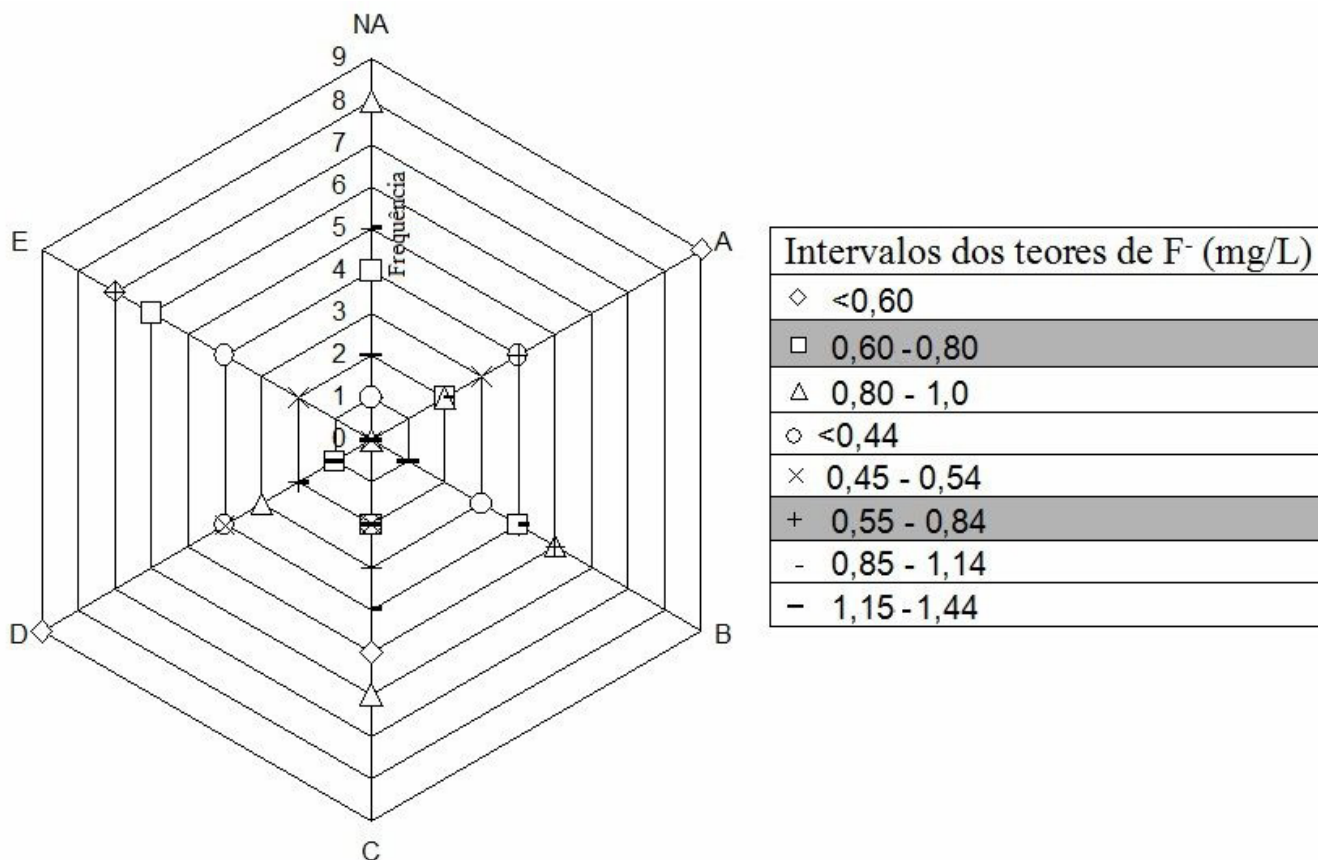
Como uma informação adicional para o presente estudo, foram levantados os dados do Proágua, de agosto de 2010 a agosto de 2011, referentes aos teores de flúor da água de abastecimento público do município de Nova Aliança. E, assim, a Figura 2 apresenta a frequência dos teores médios de flúor a que a população ficou exposta, durante os 13 meses, relacionando-os com os teores de flúor dosados nas águas oferecidas nos bebedouros das cinco escolas monitoradas, segundo o enquadramento legal e o proposto no documento publicado pelo CECOL-USP-2011<sup>21</sup>.

A FAAP, com garantia da manutenção da concentração adequada de flúor, é um método populacional efetivo para a prevenção e controle da cárie dentária. Além disso, a água deve ser oferecida, nessas condições, de maneira permanente, para que o resultado seja concretizado.

A situação da água das escolas estudadas indicou falhas na FAAP, pois itens como: concentração adequada de flúor; garantia e eficácia da fluoretação; e manutenção adequada e permanente dos níveis de flúor não foram

respeitados. E, assim, os princípios do heterocontrole foram fundamentais para apontar possíveis falhas no processo de FAAP. Portanto, tornam-se necessárias

medidas corretivas no sistema de fluoretação para beneficiar os escolares com um dos maiores avanços da saúde pública, qual seja, a prevenção da cárie dentária<sup>3</sup>.



**Figura 2.** Distribuição das frequências dos valores médios dos teores de flúor (mg/L de F<sup>-</sup>), na água de abastecimento público do município de Nova Aliança-SP (NA) e das escolas municipais (A, B, C, D, E) de acordo com a Resolução SS 250/1995 e sob a óptica do benefício (máxima redução da cárie dentária) e risco (ocorrência de fluorose dental), no período de agosto 2010 a agosto 2011

## CONCLUSÃO

Tal estudo contribuirá para a identificação de possíveis falhas na FAAP, visando fornecer subsídios aos serviços de abastecimento e órgãos de vigilância em saúde, para controle e prevenção da cárie dentária, e também para melhoria das condições e qualidade de vida das crianças, principalmente durante a fase de erupção dos dentes. Além disso, contribuirá também para que os órgãos de vigilância possam avaliar a qualidade da fluoretação da água, considerando a associação de benefício (máxima redução da cárie dentária) e risco (ocorrência de fluorose dental).

## REFERÊNCIAS

1. Scott DB. The dawn of a new era. *J Public Health Dent*. 1996;56:235-8.
2. Stevens RE. Fluoridation and the private practice of dentistry. *J Public Health Dent*. 1996;56:239-41.
3. Motter J, Moyses ST, França BHS, Carvalho ML, Moyses SJ. Análise da concentração de flúor na água em Curitiba, Brasil: comparação entre técnicas. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;29(2):120-5.
4. Gillcrist JA, Brumley DE, Blackford JU. Community fluoridation status and caries experience in children. *J Public Health Dent*. 2001;61:168-71.
5. American Dietetic Association. Position of the American Dental Association – ADA: The impact of fluoride health. *J Am Diet Assoc*. 2001;101(1):126-32.

6. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília; 2004.
7. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Geral de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2010. Pesquisa nacional de saúde bucal: resultados principais. Brasília; 2011.
8. Buzalaf MAR, Kobayashi CAK, Philippi ST. Fontes de ingestão de fluoretos. *In*: Buzalaf MAR. Fluoretos e saúde bucal. São Paulo (SP): Santos, 2008. p. 11-44.
9. Schneider Filho DA, Prado IT, Narvai PC, Barbosa SE. Fluoretação da água. Como fazer a vigilância sanitária?. Rio de Janeiro (RJ): Rede CEDROS; 1992. (Série Cadernos de Saúde Bucal 2).
10. Calvo MCM. Situação da fluoretação de águas de abastecimento público no estado de São Paulo-Brasil [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 1996.
11. Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2000;5:381-92.
12. Narvai PC. Fluoretação da água: heterocontrole no Município de São Paulo no período 1990-1999. *Rev Bras Odontol Saúde Coletiva*. 2000;2:50-6.
13. Toassi RFC, Kuhnen M, Cislighi GA. Heterocontrole da fluoretação da água de abastecimento público de Lages, Santa Catarina, Brasil. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2007;12(3):727-32.
14. Maia LC, Valença AMG, Soares EL. Operational control of water fluoridation in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(1):61-7.
15. Correia RP, Ferreira Jr CD, Maia LC, Análise da fluoretação da água de abastecimento público na zona sul do município do Rio de Janeiro. *Pesq Bras Odontoped Clín Integr*. 2001;1:17-22.
16. Centro de Vigilância Sanitária – CVS. Promoção e Qualidade de Vida: Fluoretação das Águas de Abastecimento Público. [acesso 2011 dez 13]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/not\_ler.asp?gt\_codigo=&nt\_codigo=363].
17. Centro de Vigilância Sanitária – CVS. Água Para Consumo Humano – PROÁGUA. [acesso 2011 dez 13]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/achumano.asp].
18. Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Damante CA, Ornelas F. Fluctuations in public water fluoride level in Bauru, Brazil. *J Public Health Dent*. 2002;62:173-6.
19. Ramires I, Maia LP, Rigolizzo DS, Lauris JRP, Buzalaf, MAR. Heterocontrole da fluoretação da água de abastecimento público em Bauru, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2006;40(5):883-9.
20. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 26 ago 1995, Seção 1, p. 11.
21. Centro Colaborador do Ministério da Saúde em Vigilância da Saúde Bucal. CECOL-USP- Consenso técnico sobre classificação de águas de abastecimento público segundo o teor de flúor. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.
22. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura – CEPAGRI Meteorologia Unicamp. [acesso em 2012 jul 10]. Disponível em: [http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima\_muni\_559.html].
23. Portal Rio Preto- ETA – Estação de Tratamento de Água. [acesso em 2012 jul 2]. Disponível em: [http://www.riopreto.sp.gov.br/PortalGOV/do/subportais\_Show?c=3945].
24. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Dados Gerais: Dados Gerais do município. [acesso em 2012 jul 12]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=354980].
25. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos; normas analíticas. 4. ed. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
26. Freitas VPS, Brígido BM, Alge ME, Silva CL, Zenebon O, Antunes JLF. Fluoreto em água: Estudo de metodologia analítica e níveis encontrados na região de Campinas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1996;56:29-36.
27. Instituto Adolfo Lutz. Laboratório Central e Laboratório I de Campinas. CVS. SAMA. Curso de treinamento dos Laboratórios de Saúde Pública em análise de Flúor nas águas de abastecimento público. São Paulo: CVS; 1996.
28. Lopes MRV, Santos CCM, Rigo KM. Estudo comparativo entre os procedimentos potenciométrico com eletrodo íon-seletivo para determinação de fluoreto em águas de abastecimento público segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos e com utilização minimizada de reagentes. *BIAL*. 2005;15(2):7-9.
29. American Public Health Association – APHA. Standard Methods for the Examination Of Water and Wastewater. Washington (DC): APHA; 1995.
30. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília (DF); 2005. p. 31.
31. Carvalho RB, Medeiros UV, Santos KT, Pacheco Filho AC. Influência de diferentes concentrações de flúor na água em indicadores epidemiológicos de saúde/doença bucal. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011;16(8):3509-18.

## Solução alternativa coletiva de abastecimento de água (SAC): avaliação da qualidade bacteriológica e da cloração

### Alternative collective resolution for public water supply: bacteriological and chlorination quality evaluation

RIALA6/1498

Inara Siqueira de Carvalho TEIXEIRA, Jacqueline Tanury Macruz PERESI\*, Sonia Izaura de Lima e SILVA, Aparecida Klai RIBEIRO, Rejane Alexandre Silva GRACIANO, Rodrigo Friozi POVINELLI, Cecília Cristina Marques dos SANTOS

\*Endereço para correspondência: Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto (CLR X), Instituto Adolfo Lutz. Rua Alberto Sufredine Bertoni, 2.325, São José do Rio Preto, SP, CEP: 15060-020. Tel: 17- 32242602. E-mail: jtmperesi@ial.sp.gov.br  
Recebido: 30.01.2012- Aceito para publicação: 21.08.2012

#### RESUMO

As águas de soluções alternativas coletivas de abastecimento (SAC) nos municípios situados no noroeste do estado de São Paulo foram avaliadas quanto à qualidade bacteriológica e ao teor de cloro residual livre (CRL), de acordo com a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde. Entre 2004 e 2010, foram analisadas 3.564 amostras de 66 municípios da área de abrangência do Grupo de Vigilância Sanitária 29 – São José do Rio Preto (GVS 29 – SJRP-SP) e de 26 municípios do GVS 30-Jales. Das amostras em desacordo (1.775) da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP, observou-se que 1.201 (67,7 %), 1.107 (62,4 %) e 256 (14,4 %) foram não conformes, respectivamente, em pelo menos um dos seguintes parâmetros: CRL, coliformes totais e *C. termotolerantes/Escherichia coli*. Quanto às amostras em desacordo da região do GVS 30-Jales (317), os números foram: 104 (32,8%), 257 (81,0%) e 82 (25,9%). Considerando-se a identificação de indicadores de contaminação das águas dos SAC, este estudo fornece subsídios aos serviços de abastecimento de água e de vigilância em saúde para implementar o controle e a prevenção de doenças de transmissão e de origem hídrica e para melhoria das condições e qualidade de vida das comunidades abrangidas.

**Palavras-chave.** qualidade da água, abastecimento de água, cloração, vigilância sanitária, prevenção e controle, critérios de qualidade da água.

#### ABSTRACT

The water from alternative public supply (APS) in the northwestern municipalities of São Paulo state were evaluated on the bacteriological quality and on the free residual chlorine (FRC) contents, by following the guidelines established by Decree nº 518 of the Ministry of Health. During the period from 2004 to 2010, 3,564 samples were analyzed, which were collected from 66 municipalities in the area covered by Health Surveillance Group (GVS) 29-São José do Rio Preto (GVS 29 – SJRP-SP) and from 26 municipalities of GVS 30-Jales. Among the non-complying samples from GVS 29 – SJRP-SP area (1,775), 1,201 (67.7 %), 1,107 (62.4 %) and 256 (14.4 %) showed noncompliant values at least in one of the following parameters: FRC, total coliforms and thermotolerant coliforms/*Escherichia coli*, respectively. The noncompliant samples collected from the region covered by the GVS-30 – Jales were of 104 (32.8%), 257 (81.0%) e 82 (25.9%). As the contamination indicators for drinking water from SAC were identified, this study provides support to the water supply services and to the health surveillance for implementing the control and the prevention of waterborne diseases transmission, and for improving the life conditions and quality of the covered communities.

**Keywords.** water quality, water supply, chlorination, health surveillance, prevention and control, water quality criteria.

## INTRODUÇÃO

A água, indispensável para a vida humana, pode atuar como um reservatório de diversos tipos de patógenos como parasitas, fungos, vírus e bactérias, e está diretamente relacionada com doenças de origem hídrica<sup>1</sup>.

As águas superficiais e as de aquíferos subterrâneos contêm uma série de substâncias presentes naturalmente no meio ambiente, tais como sais dissolvidos, partículas em suspensão e micro-organismos e, para serem destinadas ao consumo, necessitam de tratamento que melhore suas características organolépticas, físicas, químicas e bacteriológicas<sup>2</sup>.

A utilização de águas subterrâneas tem aumentado muito nos últimos anos e, em algumas cidades, é crescente o número de comunidades que têm optado pelo uso exclusivo desse recurso em substituição à captação de água superficial, cujo aproveitamento requer formas progressivamente mais onerosas de tratamento<sup>3</sup>.

No Brasil, a qualidade da água potável é normatizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Anvisa-MS), que define os parâmetros organolépticos, físicos, químicos e bacteriológicos<sup>4</sup>.

A partir do ano de 2004, com a implantação no cronograma do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano – SP (Proágua), de coletas de amostras de águas das soluções alternativas coletivas de abastecimento (SAC) (toda modalidade de abastecimento distinta do sistema público incluindo, entre outras, fonte, poços ou chafarizes comunitários, distribuição por veículo transportador, instalações condominiais horizontais e verticais, clubes e hotéis), tornou-se necessária a avaliação dos padrões de qualidade da água para verificar a adequação dos serviços de abastecimento ao longo dos anos, sendo essencial à proteção da saúde e das condições de vida de uma comunidade, principalmente no que se refere ao controle e prevenção de doenças de veiculação hídrica<sup>5</sup>.

A evidenciação de agentes patogênicos na água ocorre por métodos indiretos de investigação da presença ou ausência de bactérias de origem fecal, pesquisando-se bactérias indicadoras do grupo coliforme<sup>6</sup>.

Alguns elementos químicos podem estar presentes nas águas intencionalmente, como o cloro, por exemplo, que é o produto mais utilizado na etapa de desinfecção da água. Quando o cloro é adicionado à água, produz diferentes reações químicas, e há também o imediato consumo deste cloro pela matéria orgânica presente na água. E, assim, maiores quantidades de cloro deverão ser adicionadas para

garantir a permanência de cloro residual livre (CRL) na água de consumo<sup>7</sup>, sendo muito importante que exista CRL em todos os pontos da rede de distribuição, constituindo um indicador eficaz, imediato e barato que permite monitorar e assegurar a qualidade bacteriológica da água.

A cloração, aliada a outras etapas do processo de tratamento da água, é eficiente na inativação de bactérias, e a água resultante atinge a especificação de potabilidade quanto ao parâmetro microbiológico<sup>8</sup>. Para garantir tal condição, faz-se necessário o controle externo por diferentes grupos, como instituições públicas, uma vez que só o controle interno, realizado pela empresa responsável pelo sistema de abastecimento de água, pode ser insuficiente. E, assim, o heterocontrole, que é o princípio segundo o qual, se um bem ou serviço qualquer implica risco ou representa fator de proteção para a saúde pública, deve ser executado em seu benefício<sup>9</sup>.

Este estudo teve por objetivo avaliar a qualidade bacteriológica e o teor de CRL em amostras de água oriundas de SAC de municípios situados no noroeste do Estado de São Paulo, no período de 2004 a 2010. Tal estudo contribui para a identificação de indicadores de contaminação das águas dos SAC, fornecendo subsídios aos serviços de abastecimento e órgãos de vigilância em saúde para controle e prevenção de doenças de transmissão e de origem hídrica, para melhoria das condições e qualidade de vida das comunidades em questão.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 3.564 amostras de água de SAC provenientes de 66 municípios pertencentes à área de abrangência do Grupo de Vigilância Sanitária (GVS) 29 – São José do Rio Preto (GVS 29 – SJRP-SP) e de 26 do GVS 30- Jales-SP, no período de 2004 a 2010.

Para o estudo retrospectivo sobre o teor de CRL, bem como para obtenção de outras informações gerais sobre as amostras de água, foram avaliadas as fichas de coleta enviadas pelas vigilâncias sanitárias municipais - VISAs, semanalmente, com os resultados das dosagens do CRL obtidos, expressos em mg/L de cloro, no período estudado.

A dosagem do teor de CRL foi realizada em campo pelos profissionais das VISAs, pelo método colorimétrico com o reagente DPD (dietilfenileno diamina). Tal reação ocorre entre as p-diaminas aromáticas incolores e os oxidantes, como o cloro, formando as semi-quinonas de coloração violeta-avermelhada<sup>10</sup>.

Foram consideradas, nas fichas de coletas, informações como: data da entrada da amostra (dia, mês e ano), sazonalidade, endereço da coleta da amostra (rua, bairro e região) e teor de cloro medido.

As amostras avaliadas foram classificadas, segundo o teor de cloro, em satisfatórias (teor de cloro mínimo de 0,2 mg/L) ou insatisfatórias (teores de cloro menores de 0,2 mg/L).

Os parâmetros CLR, coliformes totais e coliformes termotolerantes/*Escherichia coli* (*C. term/E. coli*) foram avaliados segundo os padrões fixados pela Portaria 518/2004 – Anvisa-MS<sup>4</sup>, que estabelecia, no período estudado, os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seus padrões de potabilidade.

Os ensaios bacteriológicos foram executados segundo o método recomendado pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater<sup>6</sup>, sendo empregados, conforme disponibilidade, as técnicas de membrana filtrante ou substrato cromogênico definido ONPG-MUG<sup>6,11</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

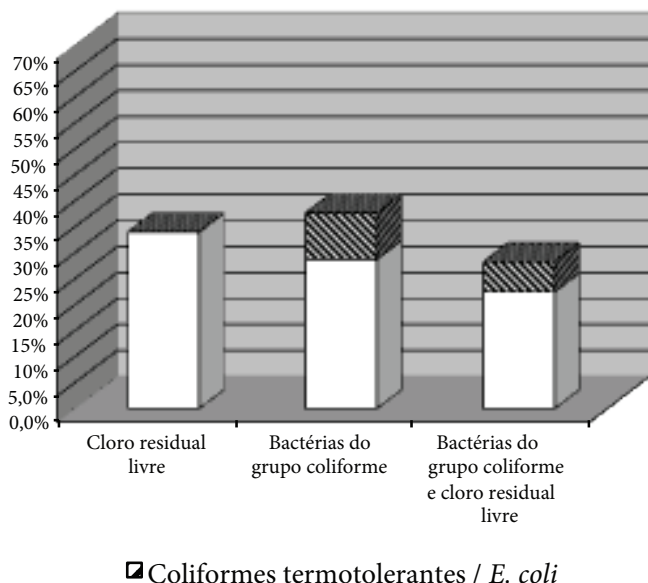
Das 2.334 e 563 amostras analisadas da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP (exceto município de São José do Rio Preto – SJRP-SP) e GVS 30 – Jales, 1.326

(56,8%) e 317 (56,3%), respectivamente, apresentaram-se em desacordo com a legislação vigente<sup>4</sup>. Os resultados do município de SJRP-SP (município sede do GVS 29 – SJRP-SP) foram apresentados separadamente, devido ao grande número de SAC cadastrado na VISA municipal em comparação aos demais municípios.

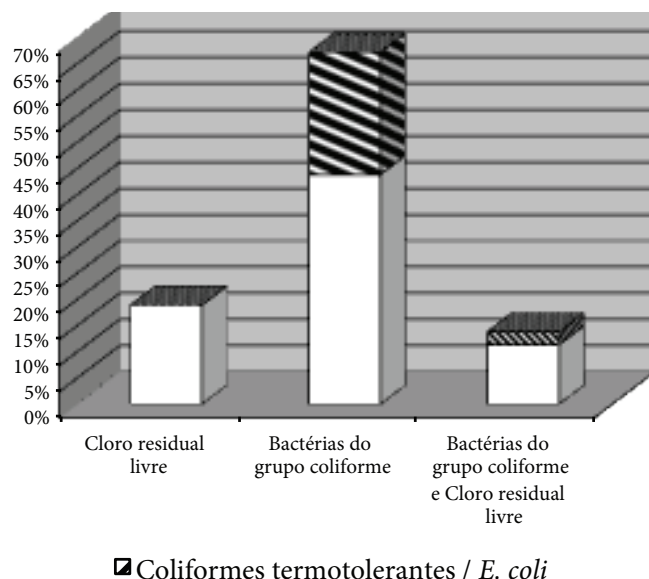
As Figuras 1 e 2 apresentam a distribuição percentual das amostras em desacordo, por parâmetro(s)<sup>4</sup> referentes à região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP e do GVS 30 – Jales-SP, respectivamente.

Com relação ao total de amostras em desacordo (1.326) da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP, observou-se que 826 (62,3%), 875 (66,0%) e 196 (14,8%) apresentaram-se em desacordo por pelo menos um dos seguintes parâmetros: CRL, coliformes totais e *C. term/E. coli*, respectivamente. Quanto às amostras em desacordo da região de abrangência do GVS 30 – Jales-SP (317), os números foram: 104 (32,8%), 257 (81,0%) e 82 (25,9%).

Com o índice expressivo de amostras não cloradas efetivamente pode-se concluir que a situação dos SAC nas regiões e período estudados (2004-2010) revelou-se vulnerável à contaminação bacteriológica, onde, das 826 amostras da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP em desacordo quanto ao teor de CRL, 298 (36,1%) apresentaram simultaneamente contaminação por coliformes totais e 77 (8,3%) também por *C. term/E. coli*. A situação da região de abrangência do GVS 30 – Jales-SP mostrou-se semelhante



**Figura 1.** Distribuição percentual, por parâmetro, das amostras de SAC em desacordo dos 65 municípios da área de abrangência do GVS 29 - SJRP, 2004-2010



**Figura 2.** Distribuição percentual, por parâmetro, das amostras de SAC em desacordo dos 26 municípios da área de abrangência do GVS 30, 2004-2010

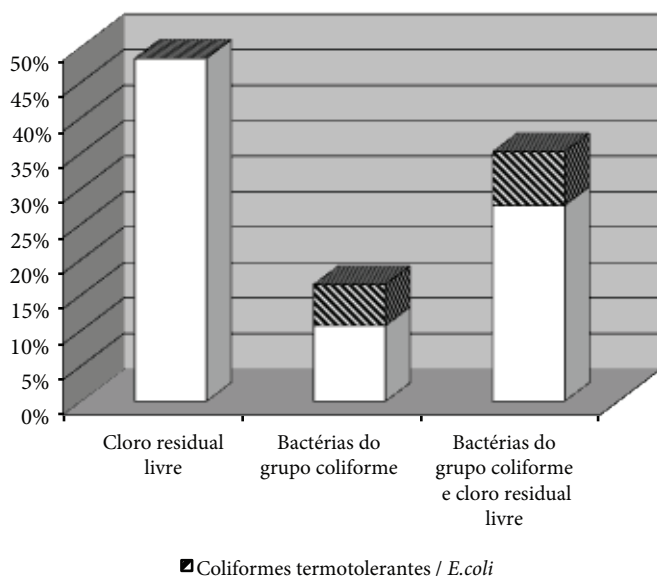


com a mesma ordem de grandeza, onde 36 (34,6%) amostras apresentaram simultaneamente contaminação por coliformes totais e 8 (7,7%) também por *C. term/E. coli*.

Embora a cloração não seja a medida universal para a descontaminação, tal técnica deve ser empregada para solucionar problemas com a qualidade da água causados por micro-organismos<sup>7,8,10</sup>. Há comprovação científica de que países que adotam a cloração da água como medida de prevenção às doenças infecciosas observam taxas de incidência destas doenças em níveis muito baixos, quando comparadas aos países que não a utilizam<sup>8</sup>.

Quanto ao município de SJRP-SP, as 667 amostras analisadas, referentes a 14 regiões administrativas, acrescida da zona zero (zona rural), referiam-se a 501 diferentes localidades, sendo 98 pontos coletados pelo menos duas vezes, o que representou um bom mapeamento do município sede, responsável pelo maior número de SAC avaliado.

Do total de amostras analisadas, 449 (67,3%) apresentaram-se em desacordo com a legislação vigente, sendo 375 (83,5%), 232 (51,7%) e 60 (13,4%), pelo menos, quanto ao CRL; coliformes totais e *C. term/E. coli*, respectivamente. Das 375 amostras em desacordo por apresentarem níveis de CRL inadequados, 124 (33,1%) encontravam-se, ainda, contaminadas por coliformes totais e 34 (9,1%) por *C. term/E. coli*, evidenciando a direta relação entre a deficiente cloração e a contaminação bacteriológica (Figura 3).



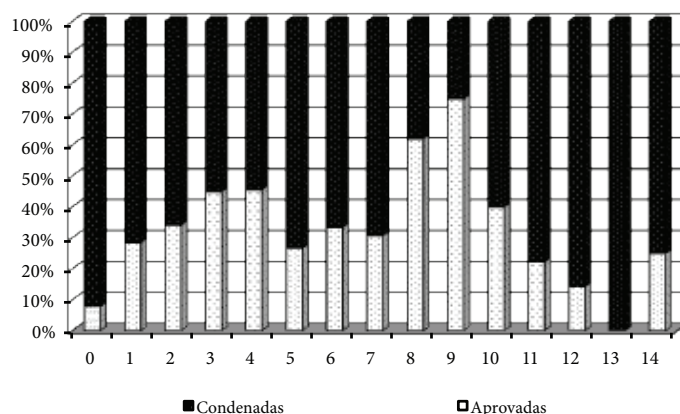
**Figura 3.** Distribuição percentual, por parâmetros avaliados, das amostras de SAC em desacordo do município de São José do Rio Preto, 2004-2010

Ainda em relação ao município de SJRP-SP, 74 (16,5%) das amostras em desacordo continham bactérias do grupo coliforme, incluindo coliformes termotolerantes/*E. coli*, embora o teor de CRL estivesse satisfatório. Esse parâmetro não foi considerado em quatro (5,4%) amostras, por terem sido coletadas diretamente dos poços (Figura 3).

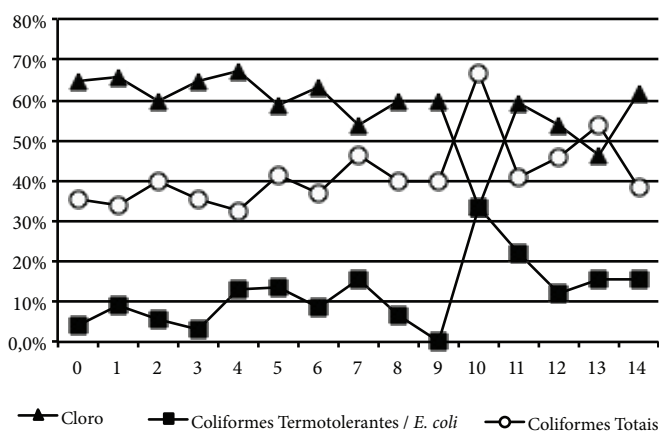
A presença de micro-organismos, mesmo em face do teor de CRL satisfatório, é um fato comprovado pelas pesquisas científicas que pode ser atribuído à formação de biofilmes, que são caracterizados pela adesão dos micro-organismos aos suportes sólidos como, por exemplo, dentre outros, compostos orgânicos e inorgânicos, podendo ser formados por quase todos os tipos de agentes microbianos sob condições favoráveis. Porém, a redução do número desses agentes aderidos à superfície tem sido comprovada com o uso de sanitizantes químicos, como o hipoclorito de sódio, por ser uma fonte de cloro<sup>12</sup>.

As regiões administrativas do município de SJRP-SP avaliadas apresentaram entre 25% e 100% das amostras em desacordo com a legislação vigente, ressaltando que 13 (86,7%) delas apresentaram frequências de amostras em desacordo superiores a 50%. As regiões denominadas 0, 11, 12, 13 e 14 permaneceram entre as mais necessitadas de atenção e de controle por parte da VISA, pois essas frequências foram superiores a 75%, conforme apresentado na Figura 4.

Com o objetivo de apresentar o panorama dos SAC do município sede da região, a Figura 5 demonstra a distribuição percentual de amostras em desacordo, por parâmetro avaliado e por região administrativa de São José do Rio Preto.



**Figura 4.** Distribuição percentual das amostras de SAC aprovadas e condenadas, por região administrativa do município de São José do Rio Preto-SP



**Figura 5.** Distribuição percentual das amostras de SAC, por parâmetros em desacordo e por região administrativa do município de São José do Rio Preto-SP

Com exceção das regiões 10 e 13, as demais apresentaram índices iguais ou superiores a 53,9% de amostras não cloradas adequadamente, atingindo índice de 67,4% na região 4, conforme distribuição dos resultados apresentados na Figura 5. A região 10 apresentou índice de contaminação por bactérias do grupo coliforme acima de 66%, embora o percentual de amostras cloradas inadequadamente tenha atingido 33%. Ressalta-se que a região 10 localiza-se na parte norte do município, com densidade demográfica de aproximadamente 3.500 hab/km<sup>2</sup> e população de 28.000 habitantes<sup>13</sup>.

Segundo as pesquisas de Nagata et al.<sup>14</sup>, a intervenção de saúde pública sobre as desigualdades relacionadas com a água deve abordar fatores fundamentais, como os demográficos, socioeconômicos, social, cultural, político e histórico, visando alcançar a máxima eficiência.

Os dados referentes às águas de SAC revelaram que a população consumidora ficou exposta a maior risco de ocorrência de doenças de veiculação hídrica quando comparados aos resultados de estudos envolvendo águas tratadas por sistemas de abastecimento público. De acordo com o estudo de Kottwitz e Guimarães<sup>15</sup>, 100% das amostras de água de abastecimento público analisadas no município de Cascavel – PR revelaram-se de acordo com a legislação vigente quanto à análise bacteriológica. Dados apresentados na pesquisa de Fernandez e Santos<sup>16</sup> corroboram os resultados do presente estudo, onde as águas de SAC tiveram maiores alterações nos parâmetros avaliados e comprometeram a qualidade da água oferecida à população em idade escolar.

Michelina et al.<sup>2</sup>, em estudo da qualidade microbiológica de água de abastecimento público da região de Araçatuba – SP, revelou 17,8% das amostras contaminadas por coliformes totais e 8,6% por coliformes termotolerantes, dados estes que se assemelham ao encontrados no presente estudo. Nascimento et al.<sup>17</sup> encontraram 57,2% das amostras de água contaminadas por bactérias do grupo coliforme no estado do Piauí no período 2003 e 2004 e, assim, chamaram atenção para as medidas corretivas das fontes contaminantes, recomendações cabíveis também para a situação revelada neste estudo, pois um dos mais importantes objetivos da microbiologia da água é a avaliação da possibilidade de ocorrência de doenças ocasionadas por ingestão de água contaminada<sup>18</sup>.

Dados nacionais e internacionais demonstraram que a contaminação das águas ocorre em várias partes do mundo, e os índices, conforme apresentado no estudo de Malheiros et al.<sup>19</sup>, variaram em torno de 41% das amostras com presença de coliformes totais e 30% de coliformes fecais na Ucrânia (Reid, 2003 citado por Malheiros, 2009)<sup>20</sup>, o que é comparável à nossa situação, onde, das 1.326 amostras em desacordo, da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP, observou-se que 875 (66,0%) e 196 (14,8%) apresentaram-se em desacordo por pelo menos um dos seguintes parâmetros: coliformes totais e *C. term/E. coli*, respectivamente. Quanto às amostras em desacordo da região de abrangência do GVS 30 – Jales-SP (317), os números foram: 257 (81,0%) e 82 (25,9%).

Embora, em algumas situações como, por exemplo, nos resultados levantados no estudo de Scorsafava et al.<sup>21</sup>, que apresentaram os aspectos físico-químicos da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano como compatíveis com os padrões de potabilidade independentemente de tratamento foi ressaltada a importância do monitoramento dessas águas para garantir um consumo seguro.

No Brasil, houve um processo de evolução do padrão de potabilidade, quanto ao aumento no número de parâmetros regulamentados nas portarias publicadas em 1977, 1999, 2004 e 2011, com adoção de estratégia do Ministério da Saúde para revisão da norma de potabilidade de água para consumo humano<sup>4,22</sup>. O grande desafio é manter um processo contínuo de revisão da norma de potabilidade de água para consumo humano, por meio de investimentos em pesquisas e maior integração entre a academia e serviços de tratamento e fornecimento de água para consumo humano<sup>23</sup>.

## CONCLUSÃO

Das 2.334, 563 e 667 amostras analisadas da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP, do GVS 30 – Jales-SP e do município de São José do Rio Preto-SP, 1.326 (56,8%), 317 (56,3%) e 449 (67,3%), respectivamente, apresentaram-se em desacordo com a legislação vigente em relação ao teor de CRL e/ou presença de bactérias do grupo coliforme.

De acordo com os dados obtidos nos últimos seis anos, notou-se uma tendência à vulnerabilidade dos SAC e a necessidade de maior controle no procedimento de cloração, pois 62,3%, 32,8% e 83,5% das amostras provenientes da região de abrangência do GVS 29 – SJRP-SP; GVS 30 – Jales-SP e do município de São José do Rio Preto-SP apresentaram, respectivamente, cloração ineficiente, com consequente exposição à contaminação microbiológica.

Portanto, a orientação e exigência legal, por parte dos órgãos de vigilância e o heterocontrole dos parâmetros legais, por parte dos laboratórios de saúde pública, devem ser uma prática permanente, tendo em vista a exposição da população consumidora e aos riscos de doenças relacionadas ao consumo de água contaminada por micro-organismos.

## REFERÊNCIAS

1. Canepari P, Pruzzo C. Human pathogens in water: insights into their biology and detection. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(3):241-3.
2. Michelina FA, Bronharoa TM, Daré BF, Ponsanoc EHG. Qualidade microbiológica de águas de sistemas de abastecimento público da região de Araçatuba, SP. *Hig Aliment*. 2006;147(20):90-5.
3. Santos CCM, Peresi JTM, Lima SI, Silveira PR, Brighetti JMP, Nascimento SC, et al. Qualidade da água de origem subterrânea oferecida à população na região de São José do Rio Preto (SP), no período de 1991 a 1999. *Hig Aliment*. 2001;15(82):47-51.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 26 mar 2004, Seção 1, nº 59, p. 266.
5. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução Estadual SS nº 4, de 10 de janeiro de 2003. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no Estado de São Paulo e dá outras providências. *Diário Oficial [do] Estado*. São Paulo, SP, 11 jan 2003, Seção 1, p. 35.
6. American Public Health Association. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 21. ed. Washington (DC): APHA; 2005.
7. Organização Mundial da Saúde – OMS. Autoridades locais, saúde e ambiente. Água: A desinfecção da água. Escritório Regional para Europa da OMS; 1999. (OPAS/HEP/99/38).
8. Bello ARC, Angelis DF, Domingos RN. Ultrasound efficiency in relation to sodium hypochlorite and filtration adsorption in microbial elimination in a water treatment plant. *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48(5):739-45.
9. Narvai PC. *Vigilância Sanitária da fluoretação das águas de abastecimento público no município de São Paulo, Brasil no período de 1990-1999* [tese de livre docência]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2001.
10. PoliControl – SCRIBD. Determinação de Cloro: DPD x OTA. [acesso 2011 ago 18]. Disponível em: [http://pt.scribd.com/doc/59885131/artigo-tecnico-cloro].
11. Marquezi MC, Gallo CR, Dias CTS. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(3):291-6.
12. Oliveira MMM, Brugnara DF, Piccoli RH. Biofilme microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(3):277-84.
13. Secretaria Municipal de Planejamento e Gestão Estratégica Conjuntura econômica de São José do Rio Preto. Bolçone OJ, org., Leme EMMT, coord. 23. ed. São José do Rio Preto (SP); 2008.
14. Nagata JM, Valeggia CR, Smith NW, Barg FK, Guidera M, Bream KD. Criticisms of chlorination: social determinants of drinking water beliefs and practices among the Tz'utujil Maya. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;29(1):9-16.
15. Kottwitz LBM, Guimarães IM. Avaliação da qualidade microbiológica da água consumida pela população de Cascavel, PR. *Hig Aliment*. 2003;17(113):54-9.
16. Fernandez AF, Santos VC. Avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água de abastecimento escolar, no município de Silva Jardim, RJ. *Hig Aliment*. 2007;21(154):93-7.
17. Nascimento MSV, Cardoso MO, Oliveira EH, Carvalho OB. Análise bacteriológica da água no estado do Piauí nos anos de 2003 e 2004. *Hig Aliment*. 2007;21(151):69-72.
18. BCQ Consultoria e Qualidade – BCQ. Microbiologia da água e sua relação com saúde pública. *Rev Analytica*. 2010;9(50):8.
19. Malheiros PS, Schäfer DF, Herbert IM, Capuani SM, Silva EM, Sardiglia CU, et al. Contaminação bacteriológica de águas subterrâneas da região oeste de Santa Catarina, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):305-8.
20. Reid DC, Edwards AC, Cooper D, Wilson E, McGaw BA. The quality of drinking water from private water supplies in Aberdeenshire, UK. *Water Res*. 2003;37(10):245-54.
21. Scorsafava MA, Souza A, Stofer M, Nunes CA, Milanez TV. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):229-32.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 dez 2011, Seção 1, nº 239, p. 39.
23. Organização Pan Americana da Saúde – OPAS. Brasil. *Processo de Revisão do Padrão de Potabilidade de Água para Consumo Humano*. [acesso 2011 Nov11]. Disponível em: [http://new.paho.org/bra/index.php?option=com\_content&task=view&id=1403&Itemid=259].

## Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) salgado seco comercializado em mercados varejistas

### Microbiologic and physical-chemical qualities of salted and dried pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) sold in retail markets

RIALA6/1499

Emilia do Socorro Conceição de Lima NUNES<sup>1\*</sup>, Robson Maia FRANCO<sup>2</sup>, Eliane Teixeira MÁRSICO<sup>2</sup>,  
Monique da Silva NEVES<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64.  
CEP: 24.230-204, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: emilia@ufpa.br

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil  
Recebido: 25.11.2011 – Aceito para publicação: 19.07.2012

#### RESUMO

Foram avaliados os parâmetros de qualidades microbiológicas e físico-químicas em 40 amostras de pirarucu salgado-seco comercializados na cidade de Belém, durante 12 meses. Os valores médios de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, atividade de água (Aa), cloretos, bases voláteis totais, ranço oxidativo e aminas biogênicas foram, respectivamente, 46,99% ( $\pm 3,71$ ); 18,82% ( $\pm 1,91$ ); 7,31% ( $\pm 4,98$ ); 29,49% ( $\pm 4,96$ ); 0,73 ( $\pm 0,04$ ); 14,60% ( $\pm 1,94$ ); 21,44 mgN/100g ( $\pm 9,76$ ); 0,35 mg.kg<sup>-1</sup> ( $\pm 0,12$ ); e não detectado. Os valores de umidade estavam acima do limite padrão em 75% das amostras. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para Aa e cloretos foi observada entre o período do defeso (D) e não defeso (ND). Os resultados microbiológicos foram em média de 5,01 logUFC/g de mesófilos; 5,76 logUFC/g de halofílicos; 4,99 logUFC/g de fungos; 1,87 logUFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP); 0,27 logUFC/g de *Enterobacteriaceae* viáveis; 2,50 logNMP/g de *Enterococcus* spp.; 2,82 logNMP/g de coliformes totais (CT); e 2,15 logNMP/g de coliformes a 45 °C (CTer). SCP e CT apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no D e ND, e CTer nas amostras dos supermercados e das feiras livres. O pirarucu salgado-seco apresentou condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e de consequente risco à saúde do consumidor.

**Palavras chaves.** peixe salgado seco, qualidade microbiológica, qualidade físico-química.

#### ABSTRACT

Forty samples of salted and dried pirarucu, sold in Belém city, were tested for evaluating the physical-chemical and microbiology qualities. The mean value of moisture, ash, lipid, protein, water activity (Wa), salt content, Total Volatile Basic Nitrogen (TVBN), Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and biogenic amines was 46.99% ( $\pm 3.71$ ), 18.82% ( $\pm 1.91$ ), 7.31% ( $\pm 4.98$ ), 29.49% ( $\pm 4.96$ ), 0.73 ( $\pm 0.04$ ), 14.60% ( $\pm 1.94$ ), 21.44 mgN/100 g ( $\pm 9.76$ ), 0.35 mg.kg<sup>-1</sup> ( $\pm 0.12$ ) and none detected, respectively. The values of moisture were above the maximum limit permitted by legislation in 75% of samples. A significant difference ( $p < 0.05$ ) in Wa and salt content was observed between “closed” and “no-closed” fishing period. The mean microbiologic counts were of 5.01 logCFU/g of mesophilic bacteria, 5.67 logCFU/g of moderate halophiles, 4.99 logCFU/g of yeast and mold, 1.87 logCFU/g of positive-coagulase *Staphylococcus* (PCS), 0.27 logCFU/g of enterobacteria, 2.50 logMPN/g of *Enterococcus* spp., 2.82 logMPN/g of total coliform (TC), and 2.15 logMPN/g of 45°C coliform (FC). PCS and TC showed significant differences ( $p < 0,05$ ) in “closed” and “no-closed” fishing period, and the FC counting in samples from supermarkets and marketplaces. The salted and dried pirarucu sold in Belém city showed unsatisfactory hygienic-sanitary quality, and characteristics of a potential risk to public health.

**Keywords.** salted and dried fish, microbiology quality, physical-chemical quality.

## INTRODUÇÃO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é um peixe amazônico carnívoro de grande porte, sendo considerado o maior peixe de escamas do planeta<sup>1</sup>. É um peixe que apresenta um rendimento médio de carne de 57%<sup>2</sup>. Tradicionalmente, é comercializado na forma salgada e seca, com a denominação de “bacalhau brasileiro”, e apresenta grande importância econômica na Região Norte do Brasil<sup>3</sup>.

A pesca predatória do pirarucu tem reduzido os estoques naturais. Devido a essa sobrepesca, desde 2004 a pesca está proibida na Bacia Hidrográfica do Rio Amazonas. No Estado do Pará, o período do defeso começa em primeiro de dezembro, estendendo-se até 31 de maio. Após esse período, a captura, a comercialização e o transporte devem atender às medidas de tamanho mínimo, como 1,50, 1,20 e 1,10 metros de comprimento total, respectivamente, para o peixe inteiro, para manta inteira e para manta seca<sup>4</sup>.

Em ensaios experimentais, é comum elaborar filé de pirarucu salgado-seco, utilizando a salga seca ou a salga mista, com adição de sal em torno de 30%, e secagens artificiais em estufas, com temperaturas e tempos padronizados (40 °C/36 horas ou 105 °C/30 minutos), até atingir um teor de umidade em torno de 40%. Essas condições controladas de processamento geram produtos com qualidade suficiente para armazenamento em temperatura ambiente<sup>5,6</sup>.

Entretanto, a salga do pirarucu ainda é realizada de modo artesanal, com as seguintes etapas: corte longitudinal da carne, formando grandes “mantas” (de três a quatro centímetros de espessura), adição do sal (de forma desuniforme) e secagem natural ao sol. Esse processamento acarreta excessiva manipulação, com elevado potencial de contaminação cruzada, podendo dar origem a produtos tecnologicamente desuniformes e com baixa qualidade<sup>3</sup>.

Em Belém, a comercialização do pirarucu salgado-seco é realizada ao longo de todo o ano, em grandes redes de supermercado e feiras livres, comumente sem embalagem, exposto a altas temperaturas e umidade típicas daquela região, e em condições higiênico-sanitárias precárias, embora apresente alto valor comercial. Esse produto apresenta aspecto, cor e textura culturalmente comparados aos do bacalhau, o que o caracteriza popularmente como o “bacalhau da Amazônia”. É consumido cozido após a dessalga e muito utilizado na culinária local.

A demanda por esse peixe salgado em todo o Brasil, e até no mercado exterior, vem aumentando e tem incentivado a oficialização de fábricas de salga que processem esse peixe de forma padronizada e com qualidade atestada<sup>7</sup>.

Pouco se sabe sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do pirarucu salgado-seco e a extensão de tais reações. Estudos isolados pesquisaram a microbiota prevista em lei e alguns requisitos físico-químicos<sup>5,6,8,9</sup>.

Em pescado salgado, embora o sal previna o crescimento microbiano, inúmeros micro-organismos podem não ser inibidos na sua presença, podendo causar deterioração, perda de qualidade e risco à saúde coletiva<sup>10,11</sup>.

Objetivou-se, no presente estudo, avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do pirarucu salgado-seco comercializado em grandes redes de supermercados e em feiras livres da cidade de Belém, estabelecer a composição centesimal do produto e comparar a qualidade durante os períodos do defeso e o liberado para comercialização.

## MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta amostras de pirarucu salgado-seco (500 gramas cada) foram obtidas em 13 supermercados e 27 feiras livres na cidade de Belém, no período de março de 2009 a setembro de 2010, em seis coletas bimestrais, abrangendo o período do defeso (17 amostras) e o período liberado para comercialização (23 amostras). As amostras obtidas nas feiras estavam expostas à venda sem embalagem, sobre bancadas de madeira e em temperatura ambiente, enquanto aquelas oriundas de supermercados estavam, em sua maioria, embaladas em filme plástico, em superfície de fácil higienização (granito, aço inoxidável) e em temperatura climatizada. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, identificadas, embaladas em caixas de papelão e transportadas, por via aérea, no mesmo dia da coleta, para os laboratórios onde foram realizadas as análises, em Niterói (RJ).

Os procedimentos analíticos físico-químicos foram realizados, em duplicata, e analisados de acordo com os métodos analíticos oficiais descritos pelo Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA<sup>12</sup>. Foi determinado o teor de umidade e voláteis a 105 °C, proteína pelo método de micro Kjeldahl, lipídio pelo método de Soxhlet, resíduo mineral fixo em mufla a 550 °C, bases voláteis totais pelo método de microdifusão (método de Conway) em amostras previamente dessalgadas<sup>13</sup>, cloretos pelo método argentométrico (MÖHR), Atividade de Água (Aa) no aparelho “Pawkit” (Decagon Devices, Inc., USA), aminas biogênicas (histamina, cadaverina e putrescina) pelo método de Cromatografia em Camada

Delgada (CCD)<sup>14</sup> com padrões de 2%, 3,5%, 5%, 7,5% e 10% de cada amina pesquisada e ranço oxidativo, que consistiu na determinação do número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)<sup>15</sup>.

As análises microbiológicas foram realizadas, em duplicata, de acordo com a Instrução Normativa nº 62, que estabelece os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água<sup>16</sup>. A enumeração de Coliformes Totais (CTo), Coliformes Termotolerantes (CTer) e de *Enterococcus* spp. foi realizada pela técnica de miniaturização<sup>17,18</sup>. Uma sub-amostra de 25 g foi homogeneizada em 225 mL de água peptonada a 0,1% (SSP), para obtenção das diluições 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>, e realizaram-se as contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (em ágar padrão para contagem), de bolores e leveduras (em ágar batata dextrose, acidificado com ácido tartárico a 10% até pH 3,5), de *Enterobacteriaceae* viáveis (em ágar vermelho violeta bile glicose), de *Staphylococcus coagulase positiva* (em ágar Baird Parker), todos incubados à 37 °C/48 horas, exceto fungos, cuja incubação foi à 30 °C por 7 dias. Para *Enterobacteriaceae* viáveis, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) típicas formadas foram confirmadas pelo teste de oxidase (oxidase negativa) e, para *Staphylococcus coagulase positiva*, foram confeccionados das UFC típicas esfregaço pelo método de coloração de Gram, para confirmar as características morfotintoriais das mesmas (cocos Gram positivos) e os testes de coagulase e catalase. Para a contagem dos microrganismos halofílicos, a homogeneização foi realizada com outra sub-amostra de 25 g de pirarucu em 225 mL de solução fosfatada salina a 3% de NaCl, obtendo-se quatro diluições (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>). Foi utilizado o ágar tripticase de soja com 3% de NaCl, e incubou-se a 37 °C por 5 a 12 dias em estufa DBO (demanda biológica de oxigênio).

O Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais (CTo) e Coliformes Termotolerantes (CTer) foi obtido a partir das três diluições em água peptonada a 0,1% (SSP), de onde 100 µL foram utilizados para determinar o NMP por meio da técnica de miniaturização<sup>17</sup>, em “ependorfs”, com 1.000 µL de caldo Fluorocult®, incubados a 37 °C/48 horas. Foram considerados positivos para CTo aqueles “ependorfs” cuja virada de cor do meio apresentaram-se azuis, e positivos para CTer, os “ependorfs” com coloração azul que apresentaram fluorescência sob luz ultravioleta a 366 nm. As séries de “ependorfs” positivas foram calculadas por meio da tabela do NMP (Tabela de McCrady). E, ao considerar-se a técnica miniaturizada, o resultado final para obtenção

do NMP/g, foi multiplicado por 10 e pelo fator de diluição intermediária e, em seguida, dividido por 100. Para o NMP de *Enterococcus* spp., utilizou-se a mesma técnica de miniaturização com 1.000 µL de Chromocult® Enterococci Broth<sup>18</sup>, incubados à 46 °C por 48 horas. Foram considerados positivos aqueles tubos cuja virada de cor do meio ficou azul e, no caso do esfregaço pelo método de Gram, quando constatada a presença de cocos Gram positivos. Todos os resultados foram transformados em logUFC/g e logNMP/g com o auxílio de uma planilha eletrônica do programa Excel.

Análise de variância (ANOVA) e teste de média (Newman-Keuls) foram realizados para determinar as diferenças entre as amostras oriundas de supermercados e feiras livres, e entre as amostras do defeso e não defeso (5% de significância). Realizou-se estatística descritiva de todos os parâmetros estudados. Análise de Regressão Linear Simples e Múltipla foi realizada para determinar a correlação entre as variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa BioEstat 2.0<sup>19</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal do pirarucu salgado-seco apresentou médias percentuais (desvio padrão) de umidade, cinzas, lipídios e proteínas, respectivamente, de 46,99% (±3,71%), 18,82% (±1,91%), 7,31% (±4,98%) e 29,49% (±4,96%). Não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras coletadas nas feiras e nos supermercados, e entre aquelas obtidas no período do defeso e no não defeso.

Resultados próximos aos obtidos nesse estudo foram descritos em amostras de pirarucu salgado-seco comercializados em Belém, com valores de 45,29% de umidade, 16,39% de cinzas, 7,39% de lipídios e 29,71% de proteínas<sup>8</sup>. Entretanto, valores distintos para o mesmo produto de 52,99%, 2,24%, 12,9% e 21,15%, respectivamente, para umidade, cinzas, lipídios e proteínas<sup>9</sup> também são relatados pela literatura. Divergência de resultados, principalmente no que diz respeito ao teor de umidade e cinzas, pode estar associada ao processo artesanal de salga realizado no pirarucu comercializado em Belém, o que gerou produtos com padrões tecnológicos e físico-químicos de qualidade inferior.

Em bacalhau salgado e seco, na cidade do Rio de Janeiro, foi observado 47,21% de umidade e 23,26% de cinzas<sup>20</sup>. Em Santa Catarina, foi determinado, respectivamente, em cação e em abrótea salgados,

**Tabela 1.** Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos das análises físico-químicas em amostras de pirarucu salgado seco de Supermercados (S) e Feiras (F)

Local coleta	n	Atividade de água	Cloretos (%)	BVT (mgN/100g)	TBARS (mg.kg <sup>-1</sup> )	AB (mg/100g)		
						H	P	C
S	13	0,71 ± 0,03 <sup>a</sup> (0,68 - 0,74) <sup>b</sup>	14,88 ± 2,05 (10,95 - 19,16)	18,60 ± 7,34 (5,67 - 29,61)	0,32 ± 0,08 (0,18 - 0,51)	nd	nd	nd
F	27	0,74 ± 0,05 (0,67 - 0,88)	14,46 ± 1,91 (11,49 - 18,83)	22,80 ± 10,59 (6,93 - 49,14)	0,37 ± 0,13 (0,20 - 0,65)	nd	nd	nd

n = número de amostras; BVT = Bases Voláteis Totais; TBARS = ranço oxidativo; AB = Aminas Biogênicas; H = Histamina; P = Putrescina; C = Cadaverina; nd = não detectado; média ± desvio padrão<sup>a</sup>; (valor mínimo - máximo)<sup>b</sup>

Média e desvio-padrão na mesma coluna com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes (p < 0,05).

**Tabela 2.** Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos das análises físico-químicas em amostras de pirarucu salgado seco no período do Defeso (D) e Não-Defeso (ND)

Período de coleta	n	Atividade de água	Cloretos (%)	BVT (mgN/100g)	TBARS (mg.kg <sup>-1</sup> )	AB (mg/100g)		
						H	P	C
D	17	0,75 ± 0,04 <sup>aA</sup> (0,72 - 0,88) <sup>b</sup>	13,73 ± 1,66 <sup>A</sup> (10,95 - 16,72)	23,50 ± 9,80 (11,97 - 42,21)	0,37 ± 0,15 (0,18 - 0,65)	nd	nd	nd
ND	23	0,68 ± 0,01 <sup>B</sup> (0,67 - 0,69)	15,24 ± 1,92 <sup>B</sup> (11,51 - 19,16)	19,92 ± 9,67 (5,67 - 49,14)	0,34 ± 0,09 (0,20 - 0,55)	nd	nd	nd

n = número de amostras; BVT = Bases Voláteis Totais; TBARS = ranço oxidativo; AB = Aminas Biogênicas; H = Histamina; P = Putrescina; C = Cadaverina; nd = não detectado; média ± desvio padrão<sup>a</sup>; (valor mínimo - máximo)<sup>b</sup>

Média e desvio-padrão na mesma coluna com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes (p < 0,05).

51,98% e 48,03% de umidade, 0,48% e 2,03% de lipídios, 23,20% e 23,17% de proteína<sup>21</sup>. Sobre esses dados, é importante ressaltar que, entre distintas espécies de peixes, pode haver diferenças fisiológicas na composição centesimal – entretanto, os parâmetros umidade, cinzas e cloretos devem obedecer um padrão de qualidade para caracterizar o produto como salgado-seco, fato relacionado com o processamento tecnológico de salga<sup>22</sup>.

Utilizando amostras de pirarucus provenientes de piscicultura<sup>6</sup> e capturados na natureza<sup>5</sup>, foi realizada a salga em condições laboratoriais, obtendo-se, respectivamente, teores de 39,05% de umidade, de 26,33% de cinzas e 40% de umidade, resultados distintos dos observados nesse estudo. Esses dados reiteram que um processo tecnológico padronizado e controlado resulta em parâmetros analíticos mais uniformes.

Para produtos salgados, é estabelecido oficialmente no Brasil um teor de umidade de até 45% para peixes magros e 40% para os gordos, teor de cloretos mínimo de 10%<sup>23</sup> e teor de cinzas de até 25%<sup>24</sup>. Os dados desta pesquisa atenderam ao regulamento quanto ao teor de cinzas e cloretos (Tabelas 1 e 2), apesar do processo de salga artesanal. Porém, 75% (30/40) das amostras estavam acima do padrão preconizado para umidade para peixes magros, sendo 27,50% (11/40) oriundas de supermercados e 47,50% (19/40) de feiras, ressaltando-se ainda que 10

amostras (25%) estavam com valores iguais ou superiores a 50% de umidade, das quais oito obtidas de feiras livres.

A umidade relativa do ar na cidade de Belém, no período de obtenção das amostras, oscilou entre 60% a 84%<sup>25</sup>, fato que pode ter propiciado o aumento da umidade do pirarucu salgado, pois alimentos conservados em ambiente com umidade relativa superior à Atividade de água (Aa) tenderão a absorver umidade do ambiente<sup>26</sup>. Desse modo, constatou-se, durante o período de obtenção das amostras, que, em 100% das feiras e alguns supermercados, esse produto estava sendo comercializado em temperatura ambiente, sem nenhum tipo de embalagem, exposto a alta umidade relativa do ar da região, que aumentou durante o período chuvoso (defeso).

Os resultados referentes às análises físico-químicas, em pirarucu salgado-seco, provenientes de supermercado e feiras livres e obtidos durante o período do defeso e do não defeso, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os níveis médios de Atividade de água (Aa), cloretos, Bases Voláteis Totais (N-BVT), ranço oxidativo (TBARS) e Aminas Biogênicas (AB), em 40 amostras analisadas, foram, respectivamente, de 0,73 ± 0,04, 14,60 ± 1,95%, 21,44 ± 9,76 mgN/100 g e 0,35 ± 0,12 mg.kg<sup>-1</sup>, e não foi observado descarboxilação de aminoácidos com consequente produção de aminas biogênicas. Em todos os parâmetros avaliados, não houve diferença estatística significativa (p <

0,05) entre os locais de obtenção das amostras (Tabela 1). Entretanto, houve diferença estatística significativa para o teor de Aa ( $p < 0,01$ ) e cloretos ( $p < 0,05$ ), entre as amostras coletadas no defeso e no não defeso (Tabela 2). Nesse período do ano (não defeso), os peixes comercializados possivelmente estavam recém-salgados, o que justificou uma menor Aa (0,68) e um maior teor de cloretos (15,24%).

Em pirarucu salgado e seco, processado em laboratório, foi encontrado 0,65 de Aa e 28,62% de cloretos<sup>6</sup>, e, em carpa salgada, os autores descreveram um teor de 24,63% de cloretos<sup>10</sup>, resultados estes que diferem dos apresentados neste estudo. Entretanto, em bacalhau salgado e seco, do mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro, foi verificado Aa semelhante aos valores obtidos neste estudo (0,73), apesar do maior teor de cloretos (19,43%)<sup>20</sup>. Essas diferenças podem ser atribuídas à variedade de concentração de sal utilizada em cada processamento e aos diferentes períodos de estocagem dos produtos.

Quanto ao conteúdo de N-BVT, o valor médio observado foi de  $21,44 \pm 9,76$  mgN/100 g (5,67 a 49,14 mgN/100 g). Como não é previsto pela legislação em vigor um limite máximo para peixes de água doce, esse valor foi comparado com os demais resultados analíticos e com os descritos na literatura. Entretanto, três amostras obtidas em feiras e a maioria das amostras no defeso apresentaram valores de N-BVT expressivamente altos, com valores iguais ou superiores a 40 mgN/100 g.

Embora não tenha sido possível obter informações sobre a qualidade inicial do pirarucu fresco e a tecnologia do processamento de salga seja desconhecida, acredita-se que esses fatores, aliados a elevadas temperaturas de estocagens e ambientes de comercialização sem condições de higiene, podem ter contribuído para os altos valores de N-BVT encontrados em algumas amostras, pois a deterioração microbiana do pescado salgado aumenta gradualmente com o tempo de estocagem, mesmo com o efeito preservativo do sal, justificado pela ação enzimática e bacteriana<sup>27</sup>.

Dados sobre o estudo de N-BVT em pirarucu salgado-seco são limitados. Entretanto, já foram citados níveis de N-BVT em pirarucu inteiro estocado em gelo, com valores de 6,65 mgN/100 g no dia zero e 18,76 mgN/100 g aos 36 dias de refrigeração; em filés de pirarucu (porção ventral) estocados a  $-18^\circ\text{C}$ , com níveis de N-BVT de 6,81 mgN/100 g no dia zero e 26,34 mgN/100 g aos 150 dias de congelamento; e em filés de pirarucu defumados a quente e conservados a  $-18^\circ\text{C}$  foi verificado 32,89 mgN/100g e 43,56 mgN/100g de N-BVT, respectivamente, nos dias zero e 150 de estocagem<sup>6</sup>. Em outros tipos de peixes salgados, como

a cavala, foi encontrado teor médio de 10,93 mgN/100g e 40,42 mgN/100g de N-BVT, respectivamente, no dia zero e 30 dias da estocagem, em condições de processamento controladas<sup>28</sup>; em carpa salgada, obtida em mercado varejista na Turquia, foi observado 55,40 mgN/100 g<sup>10</sup>; em bacalhau salgado-seco, observou-se, em 20 amostras obtidas no mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro, teor médio de 3,17 mgN/100 g de N-BVT<sup>20</sup>, caracterizando estabilidade da molécula aminoacídica; em cação e abrótea salgados e secos em condições laboratoriais, foi descrito valores de N-BVT, respectivamente, de 29,35 mgN/100 g e 33,20 mgN/100 g, para o cação, e 9,48 mgN/100 g e 17,38 mgN/100 g, para a abrótea na matéria-prima *in natura* e aos oito dias após a salga<sup>21</sup>. Podemos inferir que as diferenças podem ser fundamentadas na não padronização do processo de salga, na qualidade inicial da matéria-prima, condições fisiológicas das espécies e até nas condições de armazenamento.

Não foram encontrados na literatura dados sobre pesquisa de ranço oxidativo em pirarucu salgado-seco. Entretanto, os valores de TBARS encontrados neste estudo ( $\sigma = 0,35$  mg.kg<sup>-1</sup>) foram maiores que aqueles detectados em pirarucu congelado a  $-18^\circ\text{C}$  aos 150 dias de estocagem (0,13 mg.kg<sup>-1</sup>) e próximos aos dados obtidos em pirarucu salgado e defumado a quente (0,29 mg.kg<sup>-1</sup> aos 150 dias de estocagem a  $-18^\circ\text{C}$ )<sup>6</sup>; e menores que aqueles verificados em anchova salgada (11,45 mg.kg<sup>-1</sup>)<sup>27</sup> e em cavala salgada (1,44 mg.kg<sup>-1</sup>)<sup>28</sup>, respectivamente, aos 30 dias e nove semanas de estocagem. Estudo realizado em bacalhau salgado-seco obtido no mercado varejista do Rio de Janeiro evidenciou que 28,6% das amostras apresentaram ranço oxidativo<sup>20</sup>. Pode-se inferir que o aumento da oxidação lipídica em produtos salgados e defumados pode ser atribuído à presença do sal ou por diferentes perfis de ácidos graxos em cada espécie de peixe estudada. Portanto, o pirarucu salgado-seco comercializado em Belém apresentou perda de qualidade devido à presença de rancificação.

Pesquisadores apontam que teores acima de 1-2 mg de malonaldeído por quilograma de peixe já alteram atributos como textura e odor indicativos de deterioração<sup>29</sup>. Entretanto, apesar do pirarucu salgado e seco comercializado em Belém apresentar valores de TBARS menores que 0,65 mg.kg<sup>-1</sup>, 22,5% (9/40) das amostras apresentavam odor característico de rancificação, fato esse observado durante o preparo das amostras para as análises. Um fator importante a ser considerado é a possível complexação do malonaldeído com os produtos da decomposição proteica resultando na formação



de compostos terciários e na diminuição de TBARS em amostras de peixe salgado e estocado por longos períodos<sup>27,28,30</sup>, podendo ser uma possível justificativa para os baixos índices de TBARS encontrados nas condições deste estudo em amostras de pirarucu salgado-seco.

Quanto à presença de amins biogênicas (histamina, putrescina e cadaverina), as mesmas não foram detectadas nas amostras estudadas (Tabelas 1 e 2). Não existem relatos na literatura sobre a presença de amins biogênicas (AB) em pirarucu *in natura* ou salgado. Talvez, pelo fato de ser uma espécie dulcícola, com prováveis baixos níveis de histidina, a histamina não tenha sido estudada. Entretanto, estudo com as demais amins poderiam caracterizar o estado de conservação das amostras em função da descarboxilação de outros aminoácidos por enzimas descarboxilases bacterianas.

Com relação à legislação, no Brasil somente a pesquisa de histamina está prevista em peixes marinhos *in natura* no músculo das espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae*<sup>31</sup> até o nível máximo de 100 ppm (10 mg.100 g<sup>-1</sup>). Apesar de não estar prevista oficialmente para caracterizar o estado de conservação de peixes dulcícolas *in natura* ou salgado e seco, a pesquisa foi realizada em pirarucu salgado e seco, previamente dessalgado, pois a presença de AB reflete perda de qualidade devido à degradação de aminoácidos, e estudos realizados em

produtos salgados correlacionaram AB com a presença de bactérias que descarboxilam aminoácidos, mesmo em alta concentração de sal<sup>32,33</sup>. Desse modo, algumas pesquisas relacionaram bactérias formadoras de histamina, como *Enterobacter cloacae* em cavala salgada<sup>32</sup>, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter* sp. em “milkfish” salgado<sup>33</sup> e *Enterococcus* spp. em anchovas salgadas e fermentadas<sup>34</sup>. É provável que esses dados justifiquem a não detecção de AB em pirarucu salgado-seco, visto que o desenvolvimento de *Enterococcus* spp. e *Enterobacteriaceae* viáveis nesse produto foi insignificante (Tabela 3). Também a fase de secagem do pirarucu pode ter reduzido o desenvolvimento de bactérias formadoras de amins, devido à diminuição da Aa, pois a Aa de 0,93 já é limitante para o crescimento de todos os microrganismos Gram-negativos, enquanto os cocos ainda podem crescer em torno de 0,85 de Aa<sup>11</sup>.

Quanto aos resultados relativos aos parâmetros microbiológicos, os dados obtidos estão apresentados na Tabela 3. As contagens de mesófilos, halofílicos, fungos, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Enterobacteriaceae* viáveis (EV), *Enterococcus* spp., coliformes totais (CT) e coliformes a 45°C (CTer), nas 40 amostras estudadas, foram, em média, de 5,01 logUFC/g, 5,67 logUFC/g, 4,99 logUFC/g, 1,87 logUFC/g, 0,27 logUFC/g, 2,50 logNMP/g, 2,82 logNMP/g e 2,15 logNMP/g, respectivamente. Não houve diferença significativa (p < 0,05) entre as amostras obtidas nos

**Tabela 3.** Média, desvio-padrão, valores mínimos e máximos das análises microbiológicas realizadas em amostras de pirarucu salgado seco

Análises	Local da coleta		Período da coleta	
	Supermercado	Feira	Defeso	Não-defeso
Mesófilos (logUFC/g)	4,73 ± 0,91 <sup>a</sup> (2,77 - 6,23) <sup>b</sup>	5,14 ± 1,02 (3,17 - 6,75)	4,83 ± 1,11 (2,77 - 6,46)	5,14 ± 0,91 (3,41 - 6,75)
Halofílicos (logUFC/g)	5,75 ± 0,86 (4,08 - 6,96)	5,63 ± 1,31 (3,00 - 8,75)	5,58 ± 1,20 (4,08 - 8,75)	5,74 ± 1,17 (3,00 - 7,75)
Fungos (logUFC/g)	5,34 ± 0,89 (4,05 - 7,08)	4,87 ± 1,02 (2,60 - 6,60)	4,88 ± 0,81 (3,41 - 6,00)	5,12 ± 1,12 (2,60 - 7,08)
SCP (logUFC/g)	1,81 ± 2,54 (0,00 - 6,69)	1,90 ± 2,48 (0,00 - 7,05)	<b>0,87 ± 1,69<sup>A</sup></b> (0,00 - 5,18)	<b>2,61 ± 2,71<sup>B</sup></b> (0,00 - 7,05)
EV (logUFC/g)	0,82 ± 1,56 (0,00 - 3,76)	0,00 ± 0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 ± 0,00 (0,00 - 0,00)	0,46 ± 1,23 (0,00 - 3,76)
<i>Enterococcus</i> spp. (logNMP/g)	1,96 ± 1,82 (0,00 - 4,04)	2,76 ± 1,32 (0,00 - 4,04)	2,74 ± 1,26 (0,00 - 4,04)	2,33 ± 1,70 (0,00 - 4,04)
Coliformes Totais (logNMP/g)	2,82 ± 0,73 (1,48 - 3,66)	2,82 ± 0,78 (1,48 - 4,04)	<b>3,18 ± 0,63<sup>A</sup></b> (1,60 - 4,04)	<b>2,56 ± 0,75<sup>B</sup></b> (1,48 - 4,04)
Coliformes a 45 °C (logNMP/g)	<b>1,68 ± 0,80<sup>A</sup></b> (0,00 - 2,36)	<b>2,38 ± 1,11<sup>B</sup></b> (0,00 - 4,04)	2,33 ± 1,14 (0,00 - 4,04)	2,02 ± 1,01 (0,00 - 4,04)

Média e desvio-padrão na mesma linha com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05).

média±desvio padrão<sup>a</sup> (valor mínimo-máximo)<sup>b</sup>

SCP = *Staphylococcus* coagulase positiva; EV = *Enterobacteriaceae* viáveis

supermercados e nas feiras livres, e entre o período do defeso e não defeso para as contagens de mesófilos, halofílicos, fungos, EV e *Enterococcus* spp. Entretanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para SCP e CT entre as amostras obtidas no defeso e não defeso, e para CTer entre as amostras obtidas nos supermercados e nas feiras livres.

Em pescado salgado-seco, os padrões microbiológicos regulamentados fazem referência somente a CTer, SCP e *Salmonella* spp.<sup>35</sup>. Entretanto, as contagens microbianas vêm sendo utilizadas para avaliar a qualidade de alimentos, devido às dificuldades encontradas na detecção de micro-organismos patogênicos. Sendo assim, foi procedido contagem de mesófilos em pirarucu salgado-seco, e observou-se que os resultados encontrados foram superiores àqueles obtidos por Guimarães et al.<sup>8</sup> e por Mouchrek Filho et al.<sup>36</sup>, respectivamente de 4,41 e  $< 1,00$  logUFC/g, no mesmo alimento. Entretanto, contagens próximas às observadas no presente estudo foram descritas em outras espécies de peixe salgado, como em cação e abrótea, com valores de 5,59 e 5,60 logUFC/g de mesófilos, respectivamente<sup>21</sup> e em peixe trilha salgado e embalado a vácuo a 4 °C, com 5,70 logUFC/g de mesófilos<sup>30</sup>. Esse grupo de micro-organismos é comumente utilizado como indicativo de qualidade sanitária. Isso foi constatado nas amostras de pirarucu salgado-seco, caracterizando-o como insalubre, visto que as bactérias patogênicas de origem alimentar crescem em temperatura de 37 °C, fato este confirmado em outras pesquisas com peixes salgados (bacalhau, “milkfish” e cavala) que descreveram a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*<sup>32,33,37</sup>.

Quanto às contagens de bactérias halofílicas, os resultados encontrados nesse estudo corroboraram com os achados de Lourenço et al.<sup>5</sup> e Salgado e Ramos<sup>9</sup>, respectivamente de 5,92 e 5,48 logUFC/g, em pirarucu salgado-seco comercializado em Belém. Essa contagem microbiana está, provavelmente, relacionada com as condições higiênicas do alimento, com a qualidade do sal utilizada durante o processo da salga, bem como alterações sensoriais na cor e no odor do pescado. Dessa forma, na presente pesquisa foi detectada alteração de cor, denominada “vermelhão”, e odor rançoso em 25% (10/40) das amostras pesquisadas, sendo nove delas oriundas de feiras livres. Essas alterações sensoriais também foram observadas em outros estudos realizados em pirarucu salgado-seco na cidade de Belém<sup>5,38,39</sup>.

Com relação à pesquisa de fungos, todas as amostras apresentaram crescimento, com valores que

variaram de 2,60 a 7,08 logUFC/g. Não existem relatos na literatura desses micro-organismos em pirarucu salgado-seco. Entretanto, em outros tipos de peixes salgados estudados, as contagens de fungos foram inferiores àquelas encontradas na presente pesquisa, como em carpa salgada (3,02 logUFC/g de leveduras e 3,24 logUFC/g de bolores)<sup>10</sup> e em cação e abrótea (2,41 logUFC/g em ambos)<sup>21</sup>. Sabe-se que os fungos são responsáveis pela deterioração de alimentos desidratados quando armazenados em condições inadequadas, e a presença desse micro-organismo em alimentos pode tornar-se um perigo à saúde coletiva devido à produção de micotoxinas.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em pirarucu salgado-seco no período do não defeso foi significativamente maior ( $p < 0,01$ ) que a contagem obtida no defeso. Esse período da comercialização (não defeso) coincide com o período seco da região, com menores índices pluviométricos e, consequentemente, menor umidade relativa do ar. Possivelmente, uma manipulação inadequada favoreceu a contaminação cruzada por esse agente, que, no período do não defeso, encontrou no pirarucu condições intrínsecas favoráveis para sua multiplicação. Franco e Landgraf<sup>26</sup> descrevem que os estafilococos constituem o principal grupo microbiano que habita a pele humana, podendo-se inferir que esses agentes possam ter sido transferidos para as amostras por meio do manipulador durante o preparo e comercialização, sendo considerado um perigo potencial a saúde coletiva, em função da possibilidade de produção da enterotoxina estafilocócica.

As contagens de *Enterobacteriaceae* viáveis (EV) e *Enterococcus* spp. foram realizadas nesse estudo, visto que esses agentes são indicadores de contaminação fecal e possuem importância no controle de qualidade de alimentos. Desse modo, constatou-se um crescimento de EV quase nulo (0,27 logUFC/g), resultado que corrobora com os encontrados em anchovas salgadas ( $< 0,40$  logUFC/g no final da produção)<sup>27</sup>. Entretanto, a média de 2,50 logNMP/g de *Enterococcus* spp. constatada na presente pesquisa foi maior que aquela observada em anchovas salgadas ( $< 0,40$  logUFC/g)<sup>27</sup> e menor que os resultados verificados em carpa salgada (3,38 logUFC/g)<sup>10</sup>. Os *Enterococcus* spp. são bactérias que resistem às condições ambientais adversas e sobrevivem em alimentos dessecados e curados<sup>26</sup>. Portanto, são necessários mais estudos desse micro-organismo em peixes salgados<sup>34</sup>, dentre eles o pirarucu salgado-seco.

A média de CT no período de defeso foi significativamente maior ( $p < 0,01$ ) que os resultados observados nas amostras obtidas no período de liberação da pesca. A média dos coliformes a 45 °C (CTer) das amostras coletadas nas feiras foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada às obtidas em supermercados, ultrapassando o limite regulamentado para esse tipo de alimento, que é de 2,00 logNMP/g<sup>35</sup>. O defeso é o período do ano onde a pesca do pirarucu está proibida e a comercialização do pirarucu salgado-seco somente é permitida desde que seus estoques sejam comunicados ao órgão de fiscalização. Sendo assim, durante todo o defeso, esses estoques ficam expostos por um período mais prolongado em condições ambientais adversas, como alta temperatura e elevada umidade relativa do ar. As feiras foram os locais de comercialização do pirarucu salgado-seco, cujas condições de higiene e qualidade encontravam-se deficientes e precárias. Logo, é possível sugerir que, no período do defeso e nas feiras, ocorreram recontaminações e manipulações excessivas desse peixe após a salga. Esses achados diferem daqueles encontrados em outros estudos com pirarucu salgado-seco, que apontaram ausência<sup>8,9</sup> ou valores mínimos (0,75, <0,48 e 0,60 logNMP/g)<sup>5,36,39</sup> de coliformes fecais, fato que pode se justificar em função do delineamento experimental do presente estudo ter sido mais abrangente, referente à quantidade de amostras analisadas, número diversificado de estabelecimentos comerciais visitados e obtenção das amostras por um período de um ano. Outros experimentos com peixe salgado pontuaram a presença desses agentes, como em carpa (3,20 logUFC/g de coliformes)<sup>10</sup>, em cavala (<0,48 a 1,78 logNMP/g de CT e <0,48 logNMP/g de *Escherichia coli*)<sup>32</sup>, em peixe trilha e embalado a vácuo a 4 °C (4,24 logUFC/g de coliformes)<sup>30</sup> e em “milkfish” (entre <0,48 a 3,81 logNMP/g de CT e <0,48 a 3,34 logNMP/g de *E. coli*)<sup>33</sup>. Portanto, é possível afirmar que, apesar do efeito bactericida do sal, o pescado salgado pode apresentar uma considerável contaminação por coliformes, decorrente da manipulação inadequada, processamento sem higiene e condições ambientais de comercialização insatisfatórias, o que pode indicar a eventual presença de enteropatógenos<sup>26</sup>.

Os resultados físico-químicos e microbiológicos foram correlacionados e estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5. As correlações que apresentaram significância estatística na regressão linear simples foram entre CT, CTer e cloretos, e *Enterococcus* spp. e Aa. Os coliformes foram os únicos micro-organismos que tiveram o seu desenvolvimento inibido pela ação do sal, com

significância estatística ( $p < 0,05$ ), sendo que 22,06% e 11,49%, respectivamente, do crescimento dos CT e de CTer foram explicados pela diminuição do teor de cloretos. Esses resultados estão concordantes com aqueles encontrados em “milkfish” salgado, que descrevem as maiores contagens de CT e *E. coli* nas amostras que apresentaram os menores teores de cloretos<sup>33</sup>. Os *Enterococcus* spp. foram os micro-organismos analisados que tiveram o seu crescimento influenciado pela Aa, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), onde 30,67% do seu crescimento foi explicado pelo aumento da Aa. A alta Aa também influenciou o aumento do crescimento de *Enterococcus* spp. em anchovas salgadas<sup>27</sup>.

**Tabela 4.** Regressão Linear Simples, p e R<sup>2</sup> entre Coliformes Totais (CT) e coliformes a 45 °C (CTer) com cloretos (Cl), e entre *Enterococcus* spp. (Ent) com Atividade de Água (Aa)

Fatores associados	Modelos de Equação
CT com Cl	$(Y_{CT}) = 5,4922 - 0,1829x_{Cl}$ ( $p = 0,0026$ ; $R^2 = 22,06\%$ )
CTer com Cl	$(Y_{CTer}) = 4,8590 - 0,1859x_{Cl}$ ( $p = 0,0305$ ; $R^2 = 11,49\%$ )
Ent com Aa	$(Y_{Ent}) = -13,1238 + 20,6079x_{Aa}$ ( $p = 0,0051$ ; $R^2 = 30,67\%$ )

p = nível de significância ( $p < 0,05$ ); R<sup>2</sup> = Coeficiente de Determinação CT, CTer. e Ent. em logNMP/g

**Tabela 5.** Regressão Linear Múltipla, p, R e R<sup>2</sup> de Ranço Oxidativo (TBARS), Bases Voláteis Totais (BVT) com diferentes microrganismos estudados

Fatores associados	Modelos de equação
TBARS	$(Y_{TBARS}) = 1,48 - 0,12x_1 + 0,35x_2$ ( $p = 0,0128$ ; $R = 0,58$ ; $R^2 = 0,34$ )
BVT	$(Y_{BVT}) = -2,61 + 0,02x_1 + 0,48x_2 + 0,66x_3$ ( $p = 0,0000$ ; $R = 0,79$ ; $R^2 = 0,62$ )

p = nível de significância ( $p < 0,05$ ); R = Coeficiente de Correlação Múltipla; R<sup>2</sup> = Coeficiente de Determinação; x<sub>1</sub> = Mesófilos em logUFC/g; x<sub>2</sub> = Coliformes Totais em logNMP/g; x<sub>3</sub> = Coliformes a 45 °C em logNMP/g

As correlações que apresentaram significância estatística na regressão linear múltipla foram entre TBARS, N-BVT e alguns micro-organismos estudados. Dessa forma, 34% da produção de TBARS em pirarucu salgado-seco pode ser explicada por, pelo menos, um desses micro-organismos encontrados: mesófilos e CT, com significância estatística ( $p < 0,05$ ), sendo que os CT ( $p = 0,0075$ ) foram os micro-organismos que mais explicaram a produção do ranço oxidativo em pirarucu salgado-seco. Esses dados corroboram com os descritos para peixe-trilha salgado, onde foi verificado aos 11 dias de estocagem, uma maior concentração de TBARS e a mais alta contagem de coliformes<sup>30</sup>.

Pelo menos um desses micro-organismos estudados influenciou a produção de N-BVT ( $p < 0,05$ ): mesófilos, CT e CTer, sendo que os CTer ( $p = 0,0001$ ) seguidos dos CT ( $p = 0,0003$ ) foram os micro-organismos que mais explicaram a produção de N-BVT em pirarucu salgado-seco, resultados esses que confirmam aqueles encontrados em peixe trilha salgado, com altos níveis de N-BVT e contagens altas de mesófilos e coliformes, aos 11 dias de estocagem<sup>30</sup>, e em carpa salgada, ao verificarem-se contagens significativas de mesófilos e coliformes e um nível médio de N-BVT de 55,40 mgN/100 g<sup>10</sup>.

As contagens microbianas encontradas no pirarucu salgado-seco comercializado na cidade de Belém refletem um produto elaborado e comercializado em condições de higiene e sanidade insatisfatórias. Em média, a baixa Aa (0,73) e uma moderada concentração salina (14,60%) não foram suficientes para inibir o desenvolvimento de bactérias mesofílicas, moderadamente halofílicas, fungos, SCP e coliformes, apesar de as EV e os *Enterococcus* spp. não encontrarem condições favoráveis para o seu crescimento. Nas amostras coletadas nas feiras, ocorreram as contagens máximas de mesófilos (6,75 logUFC/g), de halofílicos (8,75 logUFC/g), de SCP (7,05 logUFC/g), de *Enterococcus* spp. (4,04 logUFC/g), e de CT (4,04 logUFC/g) e os produtos mais deteriorados (altos índices de N-BVT e TBARS), que confirmou as péssimas condições higiênico-sanitárias desse local de comercialização do pirarucu salgado-seco. Entretanto, a contagem máxima de fungos (5,34 logUFC/g) foi verificada nas amostras dos supermercados, o que possivelmente pode estar associada a uma contaminação ambiental e à menor Aa encontrada nesse local de varejo.

## CONCLUSÃO

É necessária uma padronização do processo de salga e um melhor controle de qualidade do pirarucu salgado-seco para possibilitar a elaboração de produtos com teor de umidade uniforme e dentro do limite preconizado para produto salgado-seco.

Considera-se de fundamental importância um maior rigor nas etapas seguintes à salga do pirarucu, como manipulação, armazenamento e exposição, em especial naquelas amostras comercializadas no período do defeso e nas feiras livres.

Ao considerarem-se os microrganismos viáveis observados em pirarucu salgado-seco e as alterações

físico-químicas encontradas, é possível afirmar que esse produto está sendo produzido em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, que sua forma de conservação é precária, caracterizando perda de qualidade e risco à saúde do consumidor.

Logo, há necessidade de um maior controle e fiscalização pelos órgãos competentes, principalmente nas feiras livres e durante o período do defeso, pois os resultados indicaram manipulação excessiva e sem higiene e recontaminações pós-salga.

## REFERÊNCIAS

1. Ono EA, Halverson MR, Kubitz F. Pirarucu. O gigante esquecido. *Rev Panoram Aquicult*. 2004;14(81):14-25.
2. Imbiriba EP. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazon*. 2001;31(2):299-316.
3. Lourenço LFH, Amanajás CC, Sousa A, Vieira LL. Pirarucu salgado consumido em Belém tem baixa qualidade. *J Beira Rio*. Belém (PA): UFPA, 16 de junho de 2002.
4. Brasil. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa nº 34, de 18 de junho de 2004. Aprova as normas gerais para o exercício da pesca do pirarucu (*Arapaima gigas*) na Bacia Hidrográfica do Rio Amazonas e proíbe anualmente a captura, a comercialização e o transporte do pirarucu. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 22 jun 2004, Seção 1, p. 74.
5. Lourenço LFH, Sousa CL, Silva IQ. Análises microbiológicas da carne de pirarucu (*Arapaima gigas*) seco/salgado comercializado em feiras e supermercados de Belém e elaboração de produto similar em laboratório visando estabelecer a vida de prateleira. *Rev Hig Alim*. 2008;22:15-23.
6. Oliveira PR. Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822) procedente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de seus produtos derivados [tese de doutorado]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2007.
7. Panorama da Aquicultura. Pirarucu cultivado. Carne surpreende chefs da alta gastronomia. *Rev Panoram Aquicult*. 2010; 111 [acesso 2011 abr 25]. Disponível em: [http://www.panoramadaaquicultura.com.br].
8. Guimarães MCF, Oliveira MLS, Ferreira FAM, Pereira Filho LAR. Caracterização química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas*) salgado comercializado na cidade de Belém. VII Encontro de Profissionais de Química da Amazônia; junho de 1991; Belém: Resumo do encontro. p. 144-53.
9. Salgado HLC, Ramos RGS. Qualidade físico-química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas*), seco e salgado, comercializado no município de Belém [monografia de especialização]. Belém (PA): Universidade Estadual do Pará; 2005.
10. Patir B, Inanli AG, Oksuztepe G, Ilhak OI. Microbiological and chemical qualities of salted Grey Mullet (*Chalcalburnus tarichii* PALLAS, 1811). *Int J Sci Technol*. 2006;1(2):91-8.
11. Rodrigues MJ, Ho P, López-Caballero ME, Vaz-Pires P, Nunes ML. Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food Microbiol*. 2003;20:471-81.

12. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria nº 1, de 7 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físico-Químicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 out 1981, Seção 1, p. 19381,
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Comercialização de Pescado Salgado e Pescado Salgado-seco: Cartilha Orientativa. Brasília: ANVISA/ABRAS. 2007. [Acesso 2010 jan 08]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/cartilha\_bacalhau.pdf].
14. Schutz DE, Chang GW, Bjeldanes LF. Rapid thin layer chromatographic method for the determination of histamine in fish products. *J Assoc Off Agric Chem Int*. 1976;59(6):1224-5.
15. Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT, Dugan LJr. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1960;37:44-8.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, Brasília, 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set 2003, Seção 1, p. 14.
17. Franco, RM, Mantilla SPS. *Escherichia coli* em cortes de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares predominantes. *In: 14º Seminário de Iniciação Científica*; novembro de 2004; Niterói-Rio de Janeiro. (em CD).
18. Franco RM, Leite AMO. Enumeração e identificação de *Enterococcus* spp. e cepas de *Escherichia coli* patogênico em coxas de frango e estudo de atividade antimicrobiana das cepas isoladas. *In: 15º Seminário de Iniciação*; novembro de 2005, Niterói-Rio de Janeiro. (em CD).
19. Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AS. BioEstat 2.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq; 2000.
20. Mársico ET, Silva C, Barreira VB, Mantilla SPS, Moraes IA. Parâmetros físico-químicos de qualidade de peixe salgado-seco (bacalhau) comercializado em mercados varejistas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):406-10.
21. Beirão LH, Teixeira E, Nort E, Boing SMC. Salga de cação (*Squatina argentina*) e abrótea (*Urophycis brasiliensis*). *Bol CEPPA*. 1996;14(1):25-32.
22. Brás A, Costa R. Influence of brine salting prior to pickle salting in the manufacturing of various salted-dried fish species. *J Food Eng*. 2010;100:490-5.
23. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 52, de 29 de dezembro de 2000. Submete a consulta pública o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado-seco. Brasília, 2000. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 4 jan 2001, Seção 1, p. 65.
24. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Decreto nº 3.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº 1.236, de 2 de setembro 1994, nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996, e nº 2.244, de 4 de junho de 1997. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), Brasília, DF, 1997. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 5 jun 1997, Seção 1.
25. Climatempo. Previsão do tempo na cidade de Belém, Pará. [Acesso 2010 maio 15]. Disponível em: [http://www.climatempo.com.br/previsao-do-tempo/cidade/232/belem\_para].
26. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo (SP): Atheneu; 2008.
27. Hernández-Herrero MM, Roig-Sagués AX, López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ, Mora-Ventura MT. Total volatile basic nitrogen and other physico-chemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *J Food Sci*. 1999;64(2):343-7.
28. Goulas AE, Kontominas MG. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chem*. 2005;93:511-20.
29. Connell JJ. Methods of assessing and selecting for quality. *In: Control of Fish Quality*. 2. ed. Oxford: Fishing News Books; 1990.
30. Gümüş B, Ikiz R, Ünlüsayın M, Gülyavuz H. Quality changes of salted red mullet (*Mullus barbatus* L., 1758) during vacuum packaged stored at +4 °C. *EU J Fish Aquatic Sci*, 2008;2:101-4.
31. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). Brasília, 1997. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 maio 1997, Seção 1, nº 93, p. 102.823.
32. Tsai Y, Lin C, Chang S, Chen H, Kung H, Wei C, et al. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiol*. 2005;22:461-7.
33. Hsu H, Chuang T, Lin H, Huang Y, Lin C, Kung H, et al. Histamine content and histamine-forming bacteria in dried milkfish (*Chanos chanos*) products. *Food Chem*. 2009;114:933-8.
34. Pombo CR, Mársico ET, Franco RM, Guimarães CFM, Cruz AMP, Pardi HS. Salted and fermented fish processes evaluation. *Food Sci Technol*. 2009; 44(11):2100-5.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília, 2001. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 set. 2001, Seção 1, p. 60.
36. Mouchrek Filho VE, Chaar JS, Nascimento AR, Mouchrek Filho JE, Costa IS, Martins AGLA, et al. Avaliação Microbiológica do Pirarucu (*Arapaima gigas*) seco e salgado, comercializado nas feiras livres da cidade de Manaus – Amazonas. *Cad Pesq UFMA*. 2002;13(1):14-21.
37. Almeida Filho ES, Sigarini CO, Valente AM, Andrade PF, Oliveira LAT, Franco RM, et al. Presença de microrganismos indicadores de condições higiênicas, e de patógenos em bacalhau saithe (*Pollacius virens*) salgado-seco, comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Cienc Vet*. 2004;11(3):171-3.
38. Freitas Filho EL, Freitas JA. Ocorrência de vermelhão em produtos salgados. *Rev Hig Alim*. 2002;16(94):50-4.
39. Noronha SLB, Vieira CMA, Freitas JA. Qualidade microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas*) salgado distribuído ao consumo em Belém, Pará. *Rev Ciênc Agrár*. 2000;34:139-42.

# Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais

## Chemical characteristics and functional properties of collagen

RIALA6/1500

---

Tatiane Ferreira da SILVA, Ana Lúcia Barretto PENNA\*

\*Endereço para Correspondência: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, Rua Cristóvão Colombo, 2.265, CEP: 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: analucia@ibilce.unesp.br

Recebido: 01.12.2011 – Aceito para publicação: 27.06.2012

---

### RESUMO

Muitos alimentos possuem ingredientes ou compostos bioativos que oferecem benefícios à saúde. O colágeno, que é uma proteína fibrosa encontrada nos tecidos conjuntivos do corpo, tem a função de contribuir com a resistência e elasticidade dos tecidos. Em virtude de suas características funcionais, essa proteína tem sido adicionada aos alimentos com o intuito de alcançar os efeitos terapêuticos. O presente trabalho visa mostrar como ocorre a formação do colágeno e os efeitos benéficos no organismo, bem como as características, propriedades e aplicações em alimentos.

**Palavras-chave.** propriedade funcional, suplemento alimentar, composto bioativo.

### ABSTRACT

Many types of food contain ingredients or bioactive compounds that provide health benefits. The collagen is a fibrous protein found in the connective tissue of the body, and it plays a part in the tissues resistance and elasticity. Due to their functional characteristics, this protein has been added into foods in order to achieve therapeutic effects. This paper aimed at showing how the collagen formation occurs, and the beneficial effects of this compound in the organism as well as its characteristics, properties and applications in food.

**Keywords.** functional property, food supplement, bioactive compound.

## INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade de vida tem levado o consumidor a procurar e consumir produtos saudáveis, que possam melhorar as condições de saúde e promover o bem-estar. A melhoria dos hábitos alimentares, a preocupação com a estética e a prevenção do surgimento precoce de doenças degenerativas por meio da ingestão de alimentos saudáveis contribuíram para aumentar as pesquisas de caracterização de alimentos e/ou ingredientes que possuem propriedades terapêuticas, além das funções nutricionais normais.

Os alimentos funcionais podem conter um ou mais ingredientes com propriedades terapêuticas, destacando-se: fibras alimentares, oligossacarídeos, carotenoides, proteínas, peptídeos, prebióticos, probióticos, simbióticos, fitoquímicos e ácidos graxos poli-insaturados.

O colágeno é um desses ingredientes com características funcionais, é uma proteína de origem animal, cuja função no organismo é contribuir com a integridade estrutural dos tecidos em que está presente. O colágeno é encontrado nos tecidos conjuntivos do corpo, tais como os ossos, tendões, cartilagens, veias, pele, dentes, bem como nos músculos e na camada córnea dos olhos. Porém, com o início da fase adulta, a deficiência de colágeno começa a ser notada, pois o organismo diminui sua produção, sendo necessária a sua suplementação. Em vista disso, houve um aumento no interesse pela aplicação industrial de colágeno em suplementos alimentares e em produtos alimentícios, como iogurtes, embutidos (salsicha e presunto), chás, sucos e em sobremesas de fácil preparo, tais como gelatina, pudins e maria-mole. Esses alimentos adicionados de colágeno podem ser utilizados em tratamentos para melhorar a elasticidade e firmeza da pele e prevenção de doenças, como a osteoartrite, osteoporose, hipertensão e úlcera gástrica.

Nesse contexto, o presente trabalho visa mostrar uma compilação de informações disponíveis e o conhecimento atual sobre a formação do colágeno, os efeitos benéficos ao organismo, as características químicas, propriedades funcionais e as aplicações em alimentos.

### Definição, formação no organismo e estrutura

O termo "colágeno" é utilizado para denominar uma família de 27 proteínas isoformas encontradas nos tecidos conjuntivos do corpo<sup>1,2</sup>. Em termos de

quantidade, é o composto mais importante do tecido conjuntivo e é um elemento estrutural importante em organismos multicelulares<sup>3,4</sup>.

O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada em todo o reino animal, contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Essas cadeias são organizadas de forma paralela a um eixo, formando as fibras de colágeno, que proporcionam resistência e elasticidade à estrutura presente<sup>2,3,4</sup>. As proteínas colagenosas formam agregados supramoleculares (fibrilas, filamentos ou redes), sozinhas ou em conjunto com outras matrizes extracelulares (Figura 1). Sua principal função é contribuir com a integridade estrutural da matriz extracelular ou ajudar a fixar células na matriz. O colágeno apresenta propriedades mecânicas singulares, e é quimicamente inerte<sup>5,6</sup>.

A molécula de colágeno tem 280 nm de comprimento, com massa molecular de 300.000 Da, estabilizada por pontes de hidrogênio e por ligações intermoleculares (Figura 1). A sequência de aminoácidos no colágeno é, em geral, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos-padrão. Cada molécula de colágeno pode ter até três cadeias diferentes, que se unem na formação do procolágeno<sup>1,4</sup>.

O processo de formação do colágeno ocorre principalmente durante o preparo da regeneração e do desenvolvimento do tecido embrionário. As moléculas de colágeno são secretadas pelos fibroblastos na forma de procolágeno solúvel, que é ladeado por duas estruturas globulares de peptídeos contendo nitrogênio (N-) e carbono (C-) terminais<sup>7</sup>. O procolágeno é secretado dentro das vesículas, formado no aparelho de Golgi e, em sequência, é secretado para a matriz extracelular (Figura 1). Na matriz extracelular, ocorre a ação das C- e N-peptidases, para clivar as duas estruturas globulares ligadas às extremidades do procolágeno. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogênese (produção de colágeno), pois essas estruturas globulares ligadas ao procolágeno ocupam um grande espaço em volta da molécula. Assim, é necessário que ocorra o processo de clivagem para formação do tropocolágeno (Figura 1), que começa a se unir com outras moléculas de tropocolágeno, formando as fibrilas<sup>8</sup>. As moléculas de tropocolágeno unem-se na forma de conformação torsa por meio de associações lado a lado, estabilizadas primeiramente pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas<sup>2</sup>.

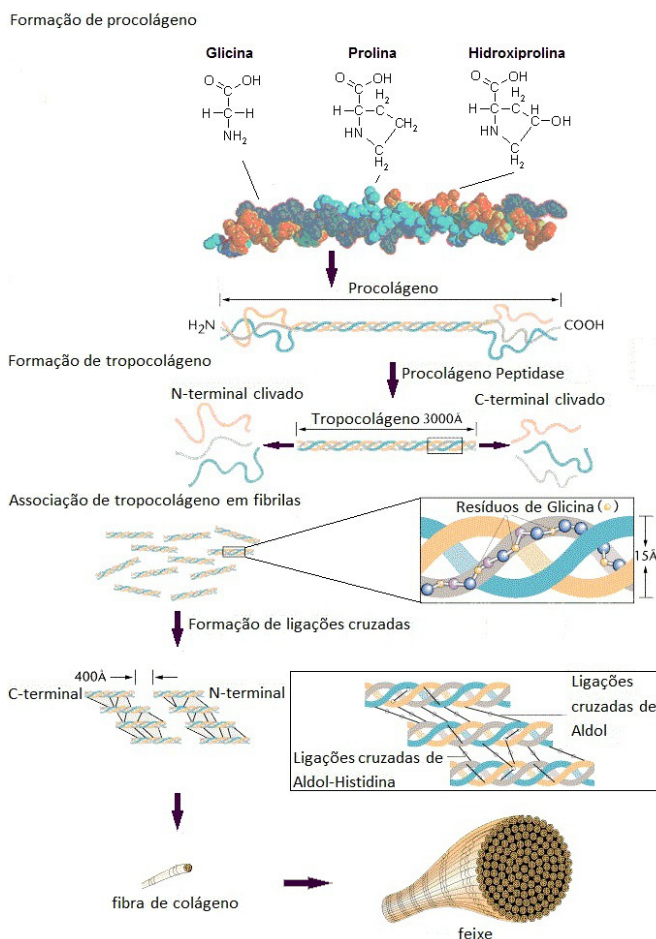
As ligações peptídicas estão presentes nas formações das ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias, resultado da interação entre os grupos aldeídos e grupos aminos livres. Essas ligações cruzadas fornecem a estabilidade e a força tensora necessária à estrutura supramolecular (Figura 1). Existem quatro resíduos-chave envolvidos no início das ligações das cadeias do tropocolágeno: dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o N-terminal; e dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o C-terminal. O arranjo cabeça-cauda-torso das moléculas de tropocolágeno permite a interação entre os peptídeos contendo o N-terminal com os peptídeos adjacentes contendo o C-terminal<sup>2</sup>.

O percurso helicoidal dessa superestrutura é destrógiro, sentido oposto ao enrolamento das hélices polipeptídicas individuais, que é levógira. Essas duas conformações permitem um enrolamento mais apertado possível das múltiplas cadeias polipeptídicas. O enrolamento da hélice triplex fornece uma grande resistência às forças de tensão, sem nenhuma capacidade para o estriamento. Assim, o colágeno apresenta uma resistência mecânica que é aumentada pelo enrolamento helicoidal de múltiplos seguimentos em uma super-hélice, de uma forma muito parecida a cordões enrolados entre si e sobre si mesmo, para formar uma corda mais resistente<sup>1,2</sup>.

Os aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, presentes na estrutura do colágeno, não são sintetizados, mas são formados por hidroxilação da prolina e lisina, respectivamente, que se inicia nos ribossomos durante a tradução do mRNA do colágeno. Assim, o processo de hidroxilação é concluído após a formação da estrutura linear<sup>8</sup>.

As fibrilas de colágeno são compostas de agregados de moléculas de colágeno ao longo de um eixo paralelo, mas cujas extremidades são igualmente sobrepostas para produzir bandas de 70 nm. O conjunto de fibrilas forma as fibras de colágeno, que se organizam em feixes<sup>4</sup> (Figura 1).

O colágeno apresenta estrutura molecular relativamente simples e é insolúvel em água, em virtude da grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos, quer no interior da proteína, quer na superfície. O colágeno representa uma exceção à regra de que os grupos hidrofóbicos precisam estar escondidos no interior da molécula proteica. O núcleo hidrofóbico, portanto, contribui menos para a estabilidade estrutural da molécula, enquanto as ligações covalentes assumem um papel especialmente importante<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Processo de formação, organização e estrutura de colágeno (adaptado de Damodaran; Parkin; Fenema<sup>2</sup>; Klug e Cumming<sup>9</sup> apud Saeidi, 2009).

### Obtenção industrial, características e propriedades do colágeno

O colágeno pode ser obtido de diversas espécies animais (bovinos, suínos, peixes, etc.). No Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da indústria de carne, em função da elevada produção brasileira de carne para exportação.

O colágeno nativo insolúvel é um subproduto do couro de curtime obtido dos resíduos da derme e do tecido subcutâneo, devendo ser pré-tratado antes que possa ser convertido em uma forma adequada para a extração. Esses materiais são previamente submetidos ao tratamento químico para a remoção de gordura e para a eliminação do cálcio. Em seguida, sofrem um aquecimento em água em temperaturas superiores a 45 °C. O pré-tratamento químico vai hidrolisar as



ligações não covalentes, de modo a desorganizar a estrutura da proteína, produzindo um adequado inchaço e solubilização do colágeno. O material resultante é submetido à secagem em estufa a uma temperatura amena e moído. Durante a última etapa, duas frações são geradas de acordo com o tamanho da partícula: o mais fino é classificado como colágeno em pó, enquanto o mais grosso corresponde às fibras de colágeno<sup>10,11,12</sup>.

O colágeno em sua forma bruta, na forma de fibras ou pó, pode ser submetido à reação de hidrólise, que leva à produção da gelatina e do colágeno hidrolisado<sup>12,13</sup>.

A característica mais importante do colágeno hidrolisado é a sua composição de aminoácidos, fornecendo um alto nível de glicina e prolina, dois aminoácidos essenciais para a estabilidade e a regeneração das cartilagens. Portanto, apresenta efeitos benéficos ao organismo<sup>13</sup>.

A gelatina é uma proteína completamente desnaturada, conseqüentemente, pode ser usada na indústria de alimentos apenas como agente emulsificante e não como fonte de fibras nutritivas. A principal propriedade da gelatina é formar soluções para produzir géis estáveis abaixo de 40 °C<sup>8</sup>.

Diversas pesquisas têm sido realizadas para investigar as propriedades e características desses compostos visando sua aplicação industrial.

Lefebvre e Antonov<sup>14</sup> realizaram um estudo sobre o efeito da fusão dos agregados de gelatina ácida e alcalina para evitar a agregação das micelas de caseína bovina. Em baixa força iônica e pH neutro, as interações entre as moléculas de gelatina e micelas de caseína foi suprimida significativamente acima de 36 °C. A fusão da gelatina ácida, acima dessa temperatura, mudou o pH no qual a formação do complexo (caseína-gelatina) foi máxima para a faixa ácida. A causa pode ser que alguns dos grupos funcionais ionizáveis da molécula de gelatina são inacessíveis devido às mudanças na conformação. Houve uma estabilidade muito alta, evitando a agregação da caseína na presença de gelatina alcalina.

Em condições normais, as fibras de colágeno são ligeiramente extensíveis, porém, em tampão ácido diluído, elas são solúveis. Quando aquecidas à temperatura de 60 °C, as ligações que estabilizam a hélice são quebradas e as moléculas adotam uma conformação desordenada. O colágeno úmido sofre uma redução drástica em seu comprimento (para 1/3-1/4 do tamanho original) e adquire elasticidade, provavelmente devido à distribuição das pontes de hidrogênio cruzadas entre

as cadeias do colágeno. Em presença de ácido, álcalis e soluções aquosas salinas, o colágeno absorve considerável quantidade de água. O ponto isoelétrico do colágeno se encontra na faixa de 6,5 a 8,5, e qualquer desvio deste pH (ou seja, mudança do ponto isoelétrico) pode provocar um inchaço não específico, podendo ser máximo<sup>8</sup>.

A crescente valorização de subprodutos industriais do colágeno é uma das principais razões para efetuar a extração de diferentes espécies de animais. A otimização das condições de extração de colágeno e de gelatina tem atraído pesquisadores na última década. As principais fontes de colágeno são pele e carne de porco, couro e ossos bovinos. Assim, devido ao crescente interesse pelo colágeno, seu uso industrial de fonte não mamífera tem aumentado. A aplicação da gelatina na área alimentar, fotográfica, cosmética e farmacêutica é baseada principalmente em suas propriedades gelificantes<sup>15</sup>.

Wolf et al.<sup>12</sup> realizaram um estudo para determinar as características físico-químicas de fibras de colágeno e de colágeno em pó para a produção de filmes. Os filmes contendo as fibras de colágeno e colágeno em pó apresentaram praticamente o mesmo teor de proteínas, porém diferiram no tamanho e formato da partícula e solubilidade em água. As características do colágeno podem ser exploradas para a produção de filmes, sendo o pó a base da matriz do filme, e as fibras agem como preenchedores, exercendo um efeito de reforço. Filmes com o conteúdo de proteínas fornecidas pela combinação de 50% de colágeno em pó e 50% de fibras de colágeno apresentaram característica uniforme, garantindo o envolvimento das fibras na matriz do filme.

Grover et al.<sup>16</sup> avaliaram a reticulação com carbodiimida e a influência da composição nas propriedades físicas e interação com mioblastos em filmes à base de colágeno ou gelatina. A reticulação dos filmes é necessária para proporcionar rigidez mecânica e dar estabilidade, e também aumentar a atividade das células pela adição de sequências de receptores específicos de peptídios na superfície da película. Os resultados indicaram que mudanças bioquímicas na composição e reticulação não somente afetou as propriedades físicas, tais como rugosidade da superfície e rigidez mecânica, mas também alterou a atividade celular dos filmes. Os filmes de gelatina são mais fracos e macios do que os filmes de colágeno. A reticulação reduziu significativamente a reatividade das células de todos os filmes, independentemente da sua composição inicial, rigidez ou rugosidade. O efeito prejudicial da reticulação

na resposta celular pode ser devido às alterações nas propriedades físicas dos filmes, assim como uma redução no número disponível de sítios de ligações celulares. Embora a reticulação possa ser usada para melhorar a rigidez mecânica e reduzir a aspereza de filmes, reduz a sua capacidade para suportar a atividade celular e pode potencialmente limitar a eficácia dos filmes à base de colágeno e multi-camada.

O efeito do tratamento térmico sobre as propriedades emulsificantes das fibras de colágeno foi estudado por Santana et al.<sup>17</sup>. Inicialmente, as fibras de colágeno tratadas por aquecimento (50 a 85 °C, por 20 ou 60 min) foram caracterizadas, e então, o efeito desse tratamento, condição de pH (3,5 e 9,2) e processo de homogeneização (20-100 MPa) foi avaliado, determinando-se as propriedades de emulsão, a separação de fases, microestrutura e tamanho de gota, e reologia. O tratamento térmico resultou em mudanças na estrutura das fibras de colágeno, porém não suficientes para melhorar suas propriedades emulsificantes. O processo de aquecimento diminuiu a carga da proteína e aumentou a solubilidade da proteína em água, o que provavelmente diminuiu a interação óleo/proteína. Como consequência, uma emulsão primária composta por fibras de colágeno tratado pelo calor mostrou a mais alta taxa e índice de cremosidade. As emulsões ácidas produzidas por homogeneização a alta pressão apresentaram alta estabilidade, com tamanho de gota similar sob variações da pressão de homogeneização (60 e 100 MPa) e da composição de proteína. As emulsões finas somente mostraram diferenças notáveis nas características reológicas, com o decréscimo na viscosidade e elasticidade com o aumento da pressão de homogeneização e intensidade do tratamento térmico. As interações estéricas e eletrostáticas entre as fibras de colágeno e as gotas de óleo foram responsáveis pela estabilidade da emulsão em pH 3,5, mas o mecanismo predominante variou com a densidade de carga e solubilidade da proteína.

Mazorra-Manzano et al.<sup>18</sup> desenvolveram um método para a determinação do teor de hidroxiprolina em produtos cárneos por eletroforese capilar (EC) como um índice do conteúdo de colágeno. O uso de colágeno hidrolisado como fonte de proteína ou agente de retenção de água é uma prática comum em produtos cárneos, porém, há um limite permitido pela legislação. O método desenvolvido EC poderia ser usado por agências reguladoras para garantir o cumprimento

dos limites máximos de adição de colágeno em carnes processadas. Os autores afirmam que o método EC foi mais preciso e exato para determinar o teor de hidroxiprolina, em comparação ao método oficial colorimétrico.

Apesar dos esforços extensivos na investigação das propriedades mecânicas típicas do colágeno, um entendimento profundo da relação entre a estrutura molecular e as propriedades mecânicas ainda não está esclarecido, em função da complexa estrutura hierárquica dos tecidos à base de colágeno.

Gautieri et al.<sup>19</sup> realizaram um estudo sobre as propriedades viscoelásticas de moléculas de colágeno e de fibrilas. Os resultados mostraram que a molécula individual de colágeno exibiu um comportamento viscoelástico não linear. O teste da modelagem molecular baseou-se em um modelo peptídico apenas com os aminoácidos glicina-prolina-hidroxiprolina, esperando, portanto, que o colágeno natural, com uma sequência primária mais variada, apresentasse propriedades viscoelásticas parcialmente diferentes do modelo peptídico. Pela primeira vez, foi relatado que a viscosidade de uma única molécula é muito menor do que a viscosidade encontrada nas fibrilas individuais de colágeno, sugerindo que o comportamento viscoso de fibrilas de colágeno e as fibras envolvem mecanismos adicionais, tais como deslizamento molecular entre as moléculas de colágeno dentro da fibrila ou o efeito de relaxamento de maiores volumes de solvente. Com base nos resultados da modelagem molecular, os autores propuseram um modelo estrutural simples que descreve o tecido colagenoso como uma estrutura hierárquica, fornecendo uma descrição ascendente em que as propriedades elásticas e viscosas formam as propriedades básicas de construção dos tecidos.

### **Efeitos terapêuticos do colágeno**

O predomínio de aminoácidos como glicina, prolina, lisina, hidroxiprolina, hidroxilisina e alanina, e a ausência da maioria dos aminoácidos essenciais como o triptofano, faz com que o colágeno seja considerado uma fonte proteica pobre para a dieta humana<sup>2</sup>. Por outro lado, o colágeno é um exemplo claro do relacionamento da estrutura proteica e a função biológica, pois fornece resistência e elasticidade nas estruturas anatômicas na qual está presente. Assim, a falta de aminoácidos essenciais do colágeno não o torna inutilizável, pois suas frações apresentam um importante papel na dieta humana

por serem consideradas fontes de fibras nutritivas e por constituírem uma fonte de proteína animal<sup>8</sup>.

Um avanço na medicina nutricional é a prevenção e o tratamento das disfunções gastrointestinais pelo consumo de fibras dietéticas, uma vez que esses compostos mantêm o funcionamento normal do trato gastrointestinal, aumentando o volume do conteúdo intestinal e das fezes, o que reduz o tempo de transição intestinal e ajuda a prevenir a constipação. Sua presença nos alimentos induz à saciedade no momento das refeições<sup>2,8</sup>. Há alguns anos, considerava-se que os vegetais e as frutas eram as maiores fontes de fibras em alimentos. Entretanto, em uma série de casos, o colágeno, e particularmente suas frações, obtidas por uma variedade de técnicas, provou ser mais eficiente do que as fibras de origem vegetal – como, por exemplo, na absorção de água e gelificação. Além disso, o colágeno é apropriado como um substituto parcial de carne<sup>8</sup>.

As fibras alimentares derivam-se principalmente da parede celular e de estruturas intercelulares dos vegetais, frutos e sementes, estando associadas a outras substâncias como proteínas, compostos inorgânicos, oxalatos, fitatos, lignina e substâncias fenólicas de baixo peso molecular. A investigação sobre o papel fisiológico das fibras da dieta no organismo não é nova. Os estudos demonstraram diversos benefícios para a saúde, prevenindo a incidência de câncer e de doenças cardiovasculares.

A habilidade das fibras em formar gel e aumentar o volume depende das propriedades do meio e determina o efeito dessas substâncias nas contrações peristálticas do intestino e nos processos de evacuação do bolo fecal. A presença de grupos funcionais na superfície da fibra capazes de interagir com os solutos assegura o envolvimento das fibras no processo, regulando a distribuição das substâncias na cavidade intestinal e sua distribuição para o meio. O envolvimento das fibras na absorção de substâncias da fase fluida do bolo fecal muda a composição da fase e, conseqüentemente, a cinética de liberação de substâncias livres para o organismo. Quando os valores de pH mudam, os grupos carboxilas das moléculas das fibras atuam como um tampão. Esses mesmos grupos mantêm a basicidade funcional das fibras, facilitando a adsorção de íons, particularmente cátions carregados de múltiplas cargas, que formam quelatos estáveis com as carboxilas<sup>20</sup>.

Diversos trabalhos evidenciaram os benefícios da ingestão de colágeno hidrolisado para o organismo: i)

melhoria da firmeza da pele; ii) proteção dos danos das articulações; iii) melhoria no tratamento da osteoporose; iv) prevenção do envelhecimento; v) anti-hipertensivo; e vi) proteção contra úlcera gástrica<sup>13, 21-27</sup>.

O colágeno apresenta várias aplicações biomédicas, pois é amplamente usado como veículo para fármacos, proteínas e genes. O colágeno apresenta aplicações bem-sucedidas, como substituto de pele humana, vasos sanguíneos e ligamentos. A base de biomateriais de colágeno deverá tornar-se uma substância matriz útil para várias aplicações médicas<sup>28</sup>.

Pesquisas sobre a relação entre o envelhecimento da pele e a produção de colágeno têm aumentado nos últimos anos. A principal característica do envelhecimento da pele é a fragmentação da matriz de colágeno na derme por ação de enzimas específicas, tal como a metaloproteinase da matriz. Essa fragmentação na estrutura da derme diminui a produção de mais colágeno. Os fibroblastos que produzem e organizam a matriz de colágeno não podem inserir o colágeno fragmentado. A perda da inserção de colágeno, ou seja, a menor produção de colágeno impede que os fibroblastos recebam informações mecânicas, ocorrendo o desequilíbrio entre a produção de colágeno e a ação de enzimas que degradam o colágeno. Na pele envelhecida, há uma menor produção de colágeno pelos fibroblastos e uma maior ação das enzimas que o degradam, e este desequilíbrio avança o processo de envelhecimento. São comprovados clinicamente que os tratamentos antienvhecimento, com ácido retinoico, laser, CO<sub>2</sub> e injeção intradérmica de ácido hialurônico, estimulam a produção de novo colágeno não fragmentado. Esses tratamentos promovem o equilíbrio entre a produção de colágeno e a ação das enzimas que o degradam, retardando o processo de envelhecimento e, conseqüentemente, melhoram a aparência e a saúde da pele<sup>23</sup>.

Zague<sup>24</sup> estudou os efeitos da ingestão do colágeno hidrolisado nas propriedades da pele. Foi levantada a hipótese que a suplementação dietética com colágeno hidrolisado promova a síntese de colágeno na pele. Provavelmente, os peptídeos de colágeno possam aumentar a ação de fibroblastos e a formação de fibrilas de colágeno de uma maneira específica. O trabalho mostrou a importante contribuição e a compreensão da viabilidade do uso de colágeno hidrolisado na dieta funcional e a necessidade de ensaios clínicos bem planejados para comprovar as alegações de benefícios na pele.

Os resultados das pesquisas de Zague et al.<sup>27</sup> indicaram que a ingestão de colágeno hidrolisado pode aumentar a produção de colágeno pelos fibroblastos e retardar o envelhecimento da pele, reduzindo as mudanças relacionadas à matriz extracelular durante o envelhecimento por estimular o processo anabólico na pele.

Guillerminet et al.<sup>29</sup> observaram a influência do uso de colágeno hidrolisado na melhoria do estado dos ossos e na prevenção da perda óssea em ratas ovariectomizadas de diferentes idades. Raloxifeno foi usado como controle positivo, uma vez que esse composto é efetivo na prevenção de mudanças induzidas nos ossos de ratas ovariectomizadas. A ingestão de colágeno hidrolisado reduziu os fatores de reabsorção óssea e restaurou densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas. Além disso, a ingestão de colágeno na dieta pode impedir a redução da densidade mineral óssea de forma tão eficiente quanto o raloxifeno. Os autores mostraram o potencial uso do colágeno hidrolisado como um complemento nutricional para prevenir a perda óssea. No entanto, trabalhos adicionais sobre a aplicação clínica são necessários para avaliar os possíveis benefícios associados com a suplementação de colágeno hidrolisado para mulheres pós-menopausa com alto risco de perda óssea.

O colágeno hidrolisado também apresentou resultados satisfatórios no tratamento da osteoartrite e da osteoporose. A ingestão diária de 10 g de colágeno hidrolisado de grau farmacêutico (PCH) reduziu a dor em pacientes com osteoartrite no joelho ou quadril e aumentou a concentração de hidroxiprolina no sangue quando comparados com o uso do placebo. O uso clínico de colágeno hidrolisado está associado com o mínimo de efeitos adversos, principalmente os gastrointestinais. O uso de colágeno hidrolisado para o tratamento de osteoartrite e osteoporose é atraente, pois pode ser utilizados por longo prazo nessas doenças crônicas<sup>21</sup>.

O colágeno hidrolisado extraído da pele de lula apresentou efeitos antioxidante e antienvelhecimento em mosca de frutas. Houve inibição da atividade da polifenoloxidase (agindo como um antioxidante), diminuindo, portanto, a produção de lipofuscina, um pigmento marrom característico do envelhecimento da mosca de fruta, ou seja, o colágeno hidrolisado apresentou atividade antienvelhecimento. Para atingir o objetivo de prevenir o envelhecimento, o colágeno hidrolisado pode ser utilizado em alimentos funcionais, cosméticos, nutracêuticos e para outros fins da saúde<sup>26</sup>.

Além dos benefícios antienvelhecimento, o colágeno também apresenta efeito anti-hipertensivo. Um estudo *in vivo* do potencial anti-hipertensivo do colágeno hidrolisado de origem bovina e suína foi realizado em ratos naturalmente hipertensos e obteve resultados satisfatórios. O colágeno hidrolisado aumentou significativamente a inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e aumentou a atividade hipotensiva. A ECA promove a conversão da forma inativa do decapeptídeo angiotensina I em octopeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor, e desativa a bradicinina, que é um vasodilatador poderoso e permeabilizador da parede dos vasos. Assim, o colágeno hidrolisado de origem bovina e suína apresenta um potencial de aplicação em tratamentos ou prevenção de hipertensão<sup>22</sup>.

A administração de isolado proteico de soro e de colágeno hidrolisado de origem bovina e suína para reduzir os efeitos da úlcera gástrica foi observada em ratos submetidos à gavagem. Esse tratamento reduziu de 40% a 77% o índice de lesão ulcerativa (ILU), dependendo da dosagem. Por exemplo, isolado proteico de soro/colágeno de origem bovina (na proporção de 375:375 mg/kg peso corporal) reduziu em 64% a ILU. O mecanismo para a proteção da mucosa envolveu uma redução da concentração plasmática de gastrina (aproximadamente 40%), um aumento significativo (50-267%) na produção de muco, e uma redução no ILU, quando as administrações foram intragástricas. A gastrina, substância sulfidrílica, a formação de muco, o fluxo de sangue mucosal, a renovação celular e a produção de bicarbonato estão envolvidos na proteção contra a úlcera gástrica. Assim, o colágeno hidrolisado, tanto de origem bovina quanto o de origem suína, apresentou maior efeito na produção de muco. Por outro lado, o efeito do isolado proteico de soro também foi dependente de compostos sulfidrílicos, resultando em um efeito protetor quando as duas proteínas foram administradas em conjunto<sup>25</sup>.

O estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, avaliou a tolerância e eficácia de um suplemento alimentar de baixo peso molecular composto por extrato hidrolisado de cartilagem de frango (colágeno BioCell) no tratamento dos sintomas da osteoartrite. Os 80 pacientes foram divididos em dois grupos: um grupo em que foi administrado 2 g de colágeno BioCell e o outro com placebo, ambos durante 70 dias. O colágeno BioCell foi bem tolerado e proporcionou redução significativa dos sintomas em pacientes que sofrem de osteoartrite.

O colágeno BioCell pode ser considerado uma forma segura e eficaz para complementar as atuais opções médicas e de alimentação para o controle dos sintomas da osteoartrite<sup>30</sup>.

### Colágeno como ingrediente funcional em alimentos

Diversos estudos foram realizados para avaliar a aplicação do colágeno como ingrediente funcional em alimentos. Há um aumento no interesse da indústria de alimentos pelo colágeno e gelatina devido às suas propriedades emulsificantes, agentes espumantes, estabilizantes coloidais, formadores de películas biodegradáveis, agentes microencapsulantes, com a tendência de substituir o material sintético pelo natural. Além de explorar diversos tipos de bioativos, agentes antimicrobianos, antioxidantes e anti-hipertensivos, os estudos também se concentram sobre o efeito da ingestão oral em animais e humanos. Assim, houve um aumento de pesquisas sobre a hidrólise enzimática do colágeno e da gelatina para a produção de peptídeos bioativos<sup>15</sup>.

Souza et al.<sup>31</sup> avaliaram sensorialmente uma sobremesa contendo colágeno hidrolisado e soja, para ser usada como alimento funcional. O colágeno hidrolisado não apresenta poder de gelatinização, sendo de fácil manuseio e pode ser usado no preparo de diversos alimentos em conjunto com a gelatina. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, tanto para os atributos sensoriais analisados como para a aceitação global dos produtos. Os atributos cor, odor, sensação na boca e textura receberam notas elevadas, assim como a aceitação global dos produtos, uma vez que os provadores não perceberam a adição de gelatina e de colágeno hidrolisado na sobremesa. O estudo mostrou a viabilidade de produção das sobremesas como fonte de colágeno hidrolisado. O consumo de 3 g de gelatina e 7 g de colágeno hidrolisado, totalizando 10 g por dia, é benéfico contra doenças como a osteoartrite e a osteoporose<sup>31</sup>.

A suplementação de colágeno hidrolisado em leite fermentado ou em água foi testada para prevenção de doenças reumáticas, como a osteoartrite. A melhor absorção dos aminoácidos do colágeno hidrolisado ocorreu no suplemento com leite fermentado. Porém, o valor funcional desse produto pode não estar somente relacionado aos aminoácidos do colágeno hidrolisado, mas combinado com outras proteínas ou peptídeos, como as proteínas do leite e peptídeos bioativos do leite fermentado<sup>13</sup>.

Ziegler e Sgarbieri<sup>32</sup> efetuaram a caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. O hidrolisado de colágeno bovino mostrou-se deficiente em todos os aminoácidos essenciais, no entanto, pesquisas têm mostrado a importância do colágeno e seus derivados na manutenção e reconstrução da pele, dos ossos, dos tecidos cartilagosos e da matriz extracelular<sup>21,33</sup>. A mistura de 60% de isolado de soro e 40% de hidrolisado de colágeno bovino apresentou elevado valor nutritivo e alto índice de solubilidade em água, mostrando-se promissora como ingrediente para a formulação de alimentos dietéticos para idosos<sup>32</sup>.

O aumento do interesse pelas fibras de colágeno e colágeno em pó em alimentos ocorreu devido às suas propriedades mecânicas, à capacidade de absorção de água, ao potencial gelificante, estabilizante e como biomaterial. Esse interesse está relacionado ao seu teor proteico, às maiores concentrações de proteínas e às frações de proteínas solúveis e insolúveis. Assim, a fim de desenvolver produtos com propriedade de textura desejada, tais como dureza e suculência, é necessário equilibrar fatores como a relação proteína solúvel/insolúvel, o tamanho da partícula do colágeno e otimizar as variáveis de processo como o pH, temperatura e adição de sal<sup>34</sup>.

A fibra de colágeno apresenta potencial como emulsificantes em produtos alimentares em pH ácido, devido ao seu alto valor de pI (6,5-8,5), quando comparado com outros emulsificantes proteicos (soja, caseína e proteína do soro)<sup>35</sup>.

O uso de goma acácia ou colágeno hidrolisado em barras de cereais *diet* foram avaliados sensorialmente. Tanto a adição de colágeno hidrolisado como de goma acácia tiveram boa aceitação. Quanto à intenção de compra, 78,4% dos provadores se manifestaram propensos a comprar a barra contendo colágeno, enquanto que, para a barra contendo goma acácia, esse valor foi de 53,3%, evidenciando a influência favorável do uso de colágeno hidrolisado em barras de cereais *diet*. A formulação contendo colágeno foi superior à formulação contendo goma acácia, demonstrando seu potencial de aplicação<sup>36</sup>.

Nunes et al.<sup>37</sup> adicionaram colágeno em mortadela de filé de tilápia, visando produzir um alimento altamente saudável, saboroso e nutritivo, que pode ser consumido diretamente, ou utilizado em lanches, petiscos e nas mais variadas receitas visando o aumento de consumo de

peixe no país, além de favorecer o consumo de colágeno de forma indireta. O produto foi avaliado sensorialmente (cor, aroma, textura, sabor e aceitação global) por um grupo de 121 provadores não treinados. Os produtos receberam alta aceitação sensorial.

Diamantino<sup>38</sup> avaliou a adição de 0,5% e 1,0% de colágeno hidrolisado em queijo prato, como substituto de gordura. Durante o processo de maturação, foram realizadas análises físico-químicas para a caracterização dos produtos, avaliação da proteólise, do derretimento e da textura. A adição dos substitutos promoveu aumento do teor de umidade e, conseqüentemente, do rendimento dos queijos. O comportamento da glicólise e da proteólise durante a maturação do queijo prato *light* modificado foi próximo ao observado para o queijo prato integral. Entretanto, não houve uma relação entre a adição dos substitutos de gordura e aumento da capacidade de derretimento e melhoria da textura do queijo prato com baixo teor de gordura. Os pesquisadores recomendam que outros estudos sejam realizados para compreender melhor o efeito do concentrado proteico de soro e do colágeno hidrolisado na qualidade dos produtos, a fim de avaliar seu potencial para a produção do queijo prato com reduzido teor de gordura com características semelhantes aos queijos integrais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, as pesquisas mostraram os potenciais efeitos benéficos para a saúde e que a suplementação de colágeno em alimentos tem demonstrado resultados promissores, com melhoria das características tecnológicas. Há necessidade de se aumentar as pesquisas dedicadas ao estudo mais detalhado das propriedades funcionais do colágeno, a fim de explorar seu potencial de aplicação em diversas áreas.

## REFERÊNCIAS

1. Lehninger AL. Princípios de bioquímica. 2. ed. São Paulo (SP): Sarvier; 1995.
2. Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2010.
3. Campbell MK. Bioquímica. 3. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2000.
4. Linden G, Lorient D. New ingredients in food processing: biochemistry and agriculture. Boca Raton (FL): CRC Press; 2000.
5. Wolf KL. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2007.
6. Moretti BR. Efeito da suplementação do leite com proteína de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição de cultura láctica em iogurtes. [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009.
7. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*. 2005;1(118):1341-53.
8. Neklyudov AD. Nutrtive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. *Appl Biochem Microbiol*. 2003;39(3):229-38.
9. Klug WS, Cumming MR. Concepts of genetics. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 1997. Apud Saeidi, N. On the control of collagen fibril organization and morphology. [dissertação de mestrado]. Boston (MA): Northeastern University; 2009.
10. Stainsby G. Gelatin gels. *In*: Pearson AM, Dutson TR & Bailey AJ, eds. Advances in meat research, collagen as a food, vol. 4 (pp. 209-22). Nova York: Van Nostrand Reinhold Company Inc. Apud Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll*. 2011;25(8):1813-27.
11. Nicoletti JF, Telis VRN. Viscoelastic and thermal properties of collagen-xanthan gum and collagen-maltodextrin suspensions during heating and cooling. *Food Biophys*. 2009;4(3):135-46.
12. Wolf KL, Sobral PJA, Telis VRN. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. *Food Hydrocoll*. 2009;23(7):1886-94.
13. Walrand S, Chiotelli E, Noirt F, Mwewa S, Lassel T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *J Agric Food Chem*. 2008;56(16):7790-5.
14. Lefebvre J, Antonov Y. The effect of the melting of the collagen-like gelatin aggregates on the stability against aggregation of the bovine casein micelles. *Colloid Polym Sci*. 2001;279(4):393-7.
15. Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll*. 2011;25(8):1813-27.
16. Grover CN, Gwynne JH, Pugh N, Hamaia S, Farndale RW, Best SM, et al. Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. *Acta Biomater*. 2012;8(8):3080-90.
17. Santana RC, Sato ACK, Cunha, RL. Emulsions stabilized by heat-treated collagen fibers. *Food Hydrocoll*. 2012;26(1):73-81.
18. Mazorra-Manzano MA, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B. A capillary electrophoresis method for the determination of hydroxyproline as a collagen content index in meat products. *Food Anal Methods*. 2012;5(3):464-70.
19. Gautier A, Vesentini S, Redaelli A, Buehler M J. Viscoelastic properties of model segments of collagen molecules. *Matrix Biol*. 2012;31;141-9.
20. Gal'perin YM, Lazarev PI. Pishchevarenie i gomeostaz (Digestion and Homeostasis), Moscow: Nauka, 1986 apud Neklyudov, AD. Nutrtive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. *Appl Biochem Microbiol*. 2003;39(3):229-38.

21. Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;30(2):87-9.
22. Faria M, Costa EL, Gontijo JAR, Netto FM. Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. *J Med Food*. 2008;11(3):560-7.
23. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol Res*. 2008;144(5):666-72.
24. Zague V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch Dermatol Res*. 2008;300(9):479-83.
25. Castro GA, Carvalho JE, Tinti SV, Possenti A, Sgarbieri VC. Anti-ulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. *J Med Food*. 2010;13(1):83-90.
26. Liu C, Peng D, Yang J, Li Y, Li J. Anti-oxidative and anti-aging activities of collagen hydrolysate. III International Conference On Biomedical Engineering And Informatics (BMEI); October of 2010; Yantai: Anais. p. 1981-84 [resumo 11663012].
27. Zague V, Freitas V, Rosa MC, Castro GA, Jaeger RG, Machado-Santelli GM. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *J Med Food*. 2011;14(6):618-24.
28. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*. 2001;221(1-2):1-22.
29. Guillerminet F, Fabien-Soulé V, Even PC, Tomé D, Benhamou CL, Roux C, et al. Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporosis Int*. 2012;23(7):1909-19.
30. Schauss AG, Stenehjem J, Park J, Endres JR, Clewell A. Effect of the novel low molecular weight hydrolyzed chicken sternal cartilage extract, BioCell Collagen, on improving osteoarthritis-related symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem*. 2012;60:4096-101.
31. Souza AB, Oliveira NCP, Garcia T, Moreira AVBM. Desenvolvimento e análise sensorial de uma sobremesa à base de colágeno hidrolisado e soja. XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; setembro de 2004; Recife: Anais.
32. Ziegler FF, Sgarbieri VC. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. *Rev Nutr*. 2009;22(1):61-70.
33. Oesser S, Adam M, Babel E, Seifert J. Oral administration of <sup>14</sup>C-labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J. Nutr*. 1999;129(10):1891-5.
34. Maximo GJ, Cunha RL. Mechanical properties of collagen fiber and powder gels. *J Texture Stud*. 2010;41(6):842-62.
35. Santana RC, Perrechil FA, Sato ACK, Cunha RL. Emulsifying properties of collagen fibers: Effect of pH, protein concentration and homogenization pressure. *Food Hydrocoll*. 2011;25(4):604-12.
36. Furlan CPB, Srebernick SM. Avaliação sensorial de barras de cereais diet com adição de goma acácia ou com adição de colágeno hidrolisado como agente ligante. XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas; setembro de 2009; Campinas: Anais. [resumo ICO8442]. [acesso 2011 out 27]. Disponível em: [<http://www.puc-campinas.edu.br/websist/portal/pesquisa/ic/pic2009/htm/resumos.htm>].
37. Nunes A, Neto C, Souza M, Feliciano R, Formigoni MLM, Isausti EO. Processamento de mortadela de filé de Tilápia com fibras de colágeno. *Rev Eletrônica Educ Tecnol*. 2011;5(10):1-25.
38. Diamantino, IM. Efeito de substitutos de gordura na qualidade de queijo Prato com reduzido teor de gordura. [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2011.

# Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil

## Identity and quality of propolis from four regions of Brazil

RIALA6/1501

Adriane Alexandre Machado de MELO, Adriana Hitomi MATSUDA, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. Tel.: (55) (11) 3091-3684. E-mail: ligiabi@usp.br  
Recebido: 06.12.2011 – Aceito para publicação: 30.07.2012

### RESUMO

A própolis, substância produzida pelas abelhas a partir de partes das plantas, tem sido consumida para fins terapêuticos. Dada a escassez de dados sobre a própolis comercializada no Brasil, este estudo avaliou os parâmetros de identidade e qualidade de própolis: umidade, resíduo mineral fixo, cera, massa mecânica, fenólicos totais, flavonoides totais, substâncias solúveis em etanol, índice de oxidação e espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, em amostras coletadas nas regiões Nordeste (NE), Sudeste (SE), Sul (SU) e Centro-Oeste (CO) do país. Os resultados obtidos foram comparados com os padrões estabelecidos na legislação brasileira, e foi realizada uma comparação entre as quatro regiões. As 12 amostras coletadas na região SE e as três da região CO atenderam a todos os requisitos previstos em legislação. Porém, resultados desconformes foram detectados em uma das dez amostras da região SU e em cinco das oito da região NE. As médias nas amostras da região NE foram estatisticamente semelhantes nas amostras da região SU em cinco dos oito parâmetros quantitativos: teor de umidade, massa mecânica, índice de oxidação, fenólicos totais e flavonoides totais. O teor de fenólicos foi o único parâmetro cuja média foi estatisticamente igual nas amostras das quatro regiões.

**Palavras-chave.** própolis, índice de oxidação, fenóis, flavonoides, qualidade.

### ABSTRACT

Propolis is a substance produced by bees from some plant parts, and it has been consumed by the population with therapeutic purposes. Given the lack of data on the propolis commercialized in Brazil, this study aimed at assessing the identity and quality parameters of propolis (moisture, fixed mineral residue, wax, mechanic mass, total phenolics, flavonoids, ethanol-soluble substances, oxidation index, ultraviolet and visible absorption spectra) in samples collected from Brazilian Northeast, Southeast, South and Middle West regions. The found results were compared with those established by the Brazilian legislation, and also among the four regions. Twelve samples collected from the Southeast region and three samples from the Middle West region complied with those limits established by legislation in force. However, noncomplying results were detected in one of 10 samples from the South region and in five of eight samples from the Northeast region. The mean values in samples from the Northeast region were statistically similar to those from the Southeast region in five of eight quantitative parameters: moisture, mechanic mass, oxidation index, total phenolics and flavonoids. Phenolics were the only parameter in which the mean value was statistically equal among the samples from the four regions.

**Keywords.** propolis, oxidative index, phenols, flavanoids, quality.



## INTRODUÇÃO

A própolis é o produto apícola elaborado a partir do material resinoso, gomoso e balsâmico coletado das árvores pelas abelhas, o qual elas modificam acrescentando secreções salivares, cera e pólen<sup>1</sup> e utilizam para diversos propósitos na colmeia, como selar orifícios, o que evita a entrada de intrusos e mantém a temperatura da colmeia em torno de 35 °C, e revestir a parede interna dos opérculos, criando não só uma barreira física como um ambiente asséptico para o desenvolvimento das larvas, possível em razão da ação antimicrobiana de certos componentes da própolis<sup>2</sup>. Sua composição química é bastante complexa e determinada, basicamente, pelo perfil químico da flora visitada pelas abelhas<sup>3</sup>. Entre as fontes vegetais da própolis brasileira estão a *Baccharis* spp., particularmente a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo); *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio); *Araucária angustifolia* (pinheiro brasileiro); e o *Eucalyptus citriodora* (eucalipto)<sup>3,4</sup>.

Mais de 200 componentes já foram identificados em diferentes amostras de própolis que, de modo geral, contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de pequenas quantidades de alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido ascórbico (C), alfa-tocoferol (E) e ácido pantotênico (B5)<sup>5</sup>. Também são encontradas quantidades significativas de metabólitos secundários de plantas, associados a propriedades biológicas de interesse, como ação antimicrobiana<sup>6</sup>, antioxidante<sup>7</sup>, anti-inflamatória<sup>8</sup> e anticarcinogênica<sup>9</sup>.

Não há dados precisos sobre a produção de própolis no Brasil, mas o Serviço Nacional de Apoio às Micro e Pequenas Empresas aponta grande demanda externa pelo produto nacional, sendo a Coreia do Sul, China e Japão os principais compradores<sup>10</sup>, onde o produto tem sido estudado e utilizado em alimentos e bebidas com a finalidade de manter ou melhorar a saúde humana. Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou uma legislação específica onde constam padrões de identidade e qualidade da própolis produzida no país, visando os mercados interno e externo. Porém, não foram estabelecidos os métodos de análises a serem utilizados<sup>1</sup>. Embora a legislação já esteja em vigor há dez anos, poucos dados foram encontrados sobre a qualidade da própolis produzida no Brasil.

Assim, este estudo teve por objetivo avaliar parâmetros de identidade e qualidade da própolis coletada em quatro regiões do Brasil (Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste) e comparar os resultados obtidos com os padrões estabelecidos na legislação brasileira, e ainda realizar um comparativo entre as quatro regiões.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

As amostras de própolis de abelha *Apis mellifera* foram adquiridas *in natura*, entre os anos de 2003 e 2005, de apicultores ou entrepostos de quatro regiões do Brasil, perfazendo um total de 33 amostras (Tabela 1). As impurezas (poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer outro tipo de material estranho) foram retiradas e, em seguida, as amostras foram trituradas, peneiradas em tamis de 18 “mesh” (1.000 micras), homogeneizadas, pesadas e armazenadas a 5°C até o momento das análises.

**Tabela 1.** Localidades de coleta de amostras de própolis *in natura* em quatro regiões do país

Região/Estado	Município
<b>Nordeste</b>	
Bahia	Mucuri, Irecê, Palmeiras, Lençóis
Rio Grande do Norte	João Câmara
Maranhão	São Luiz
Paraíba	Santa Terezinha, João Pessoa
<b>Sudeste</b>	
Minas Gerais	Barbacena, Itabira, Lavras, Patrocínio, Juiz de Fora
São Paulo	Salesópolis, Barra do Chapéu, Paraibuna, Cajamar, Pilar do Sul
Rio de Janeiro	Itaboraí, Paraíba do Sul
<b>Sul</b>	
Paraná	São José da Boa Vista, São Mateus do Sul, Wenceslau Brás, Ivaí
Santa Catarina	Içara, Anitápolis, Itajaí, Araranguá
Rio Grande do Sul	Pelotas, Taquara
<b>Centro-Oeste</b>	
Mato Grosso do Sul	Campo Grande, Mundo Novo, Angélica

### Métodos

#### *Preparo do extrato etanólico de própolis (EEP)*

O extrato foi preparado com base no procedimento descrito por Park et al.<sup>11</sup> com modificações propostas por Matsuda<sup>12</sup>. Para tal, fez-se a adição de 15 mL de etanol a 80% em 0,3 g de própolis triturada,

previamente desidratada em estufa a 60 °C, e procedeu-se incubação por 10 minutos, sob agitação. Em seguida, fez-se a centrifugação a 3.000 rpm por 3 min (centrífuga Hermle Z 320) e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (Advantec 5A com 0,06 mg cinzas/90 mm) e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. O mesmo procedimento foi realizado por mais três vezes, porém com 10 mL de etanol a 80%. O resultado de cada extração foi transferido para o mesmo balão e o volume completado com etanol a 80%.

#### *Umidade*

O teor de umidade foi determinado por gravimetria pela perda de água por secagem sob infravermelho, em analisador de umidade modelo MA 45 marca Sartorius<sup>12,14</sup>.

#### *Resíduo mineral fixo*

A determinação foi realizada por gravimetria, por incineração em mufla, marca EDG Equipamentos modelo EDGCON 1P, a 550 °C<sup>12,15</sup>.

#### *Cera*

O teor de cera foi determinado a partir de 1 g de amostra, previamente triturada, que foi pesada em cartucho de celulose e extraída em aparelho Soxhlet com 110 mL etanol absoluto por 6 horas. Após esse processo, o extrato obtido permaneceu por 24 h a 5 °C. Em seguida, foi realizada a filtração a frio em papel de filtro nº 3, previamente pesado. O papel de filtro foi seco em estufa a 105 °C e, em seguida, colocado em dessecador até peso constante. Após a filtração, o papel foi novamente pesado<sup>12,16,17</sup>. Para o cálculo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Cera (\%)} = (P3 - P2) / P1$$

Sendo: P1 = massa inicial da amostra (g); P2 = peso do papel de filtro (g); P3 = peso do papel de filtro + cera (g)

#### *Massa mecânica*

A partir do resíduo da determinação do teor de cera, foi determinada a massa mecânica. Para tanto, o cartucho de celulose contendo o resíduo foi seco em estufa a 80 °C por 2 horas e, em seguida, foi colocado em dessecador e pesado. Esse procedimento foi repetido até peso constante<sup>12,17</sup>.

#### *Substâncias solúveis em etanol*

A partir do EEP foi determinada a quantidade de substâncias solúveis em etanol pesando, em pesa-filtro previamente tarado, 3 g de extrato etanólico, e submetido à secura em banho-maria, sob agitação ocasional, até evaporação. Por fim, o resíduo foi seco em estufa à temperatura de 105 °C até peso constante<sup>12</sup>.

#### *Índice de oxidação*

Para a determinação do índice de oxidação, foi pesado 0,2 g de amostra de própolis, dissolvida em 5 mL de álcool etílico e deixada em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 100 mL de água destilada e a solução filtrada em papel de filtro nº 3. A 1 mL do filtrado foram adicionados 40 mL de água destilada e 1 mL do ácido sulfúrico a 20%. A mistura foi agitada por 1 min e, depois, foi acrescentado 5µL de permanganato de potássio 0,1 N. Com o auxílio de um cronômetro foi medido o tempo, em segundos, que corresponde ao tempo gasto para o desaparecimento da cor rosa, a qual determina o índice de oxidação<sup>12,16</sup>.

#### *Determinação qualitativa de compostos fenólicos*

A determinação do espectro de absorção dos extratos etanólicos de própolis foi realizada segundo o método descrito por Park et al.<sup>18</sup> e Matsuda<sup>12</sup>, e os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 195 a 450 nm, em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-1700).

#### *Determinação quantitativa de compostos fenólicos*

A determinação dos compostos fenólicos totais, com base em ácido gálico, foi realizada a partir do EEP, de acordo com a metodologia descrita por Woisky<sup>19</sup>, Marcucci<sup>20</sup> e Matsuda<sup>12</sup>. A curva de calibração foi feita usando-se uma solução padrão de ácido gálico 1 mg/mL em etanol, no intervalo de 0,1-1,5 mg/mL. Foi estabelecida a equação da reta utilizando-se o método da regressão linear. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-1700) em comprimento de onda de 760 nm, em cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico. O teor de fenólicos totais em ácido gálico foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$F (\%) = Abs \times CA \times FD / m$$

Sendo: F (%) = Teor de fenólicos totais em ácido gálico em porcentagem (%) de amostra seca; CA = coeficiente angular; FD = fator de diluição; d = massa de própolis testada (g)

#### Determinação quantitativa de flavonoides totais

A determinação quantitativa de flavonoides totais, com base em quercetina, foi realizada a partir do EEP, conforme metodologia descrita por Ikegaki<sup>21</sup> e Matsuda<sup>12</sup>. Fez-se uma curva padrão com quercetina, no intervalo de 0,01-0,2 mg/mL. Foi estabelecida a equação da reta utilizando-se o método da regressão linear. A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-1700) em comprimento de onda de 425 nm, em cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico. O teor de flavonoides foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$TF (\%) = C_{(mg/mL)} \times 100 / d$$

Sendo: TF (%) = Teor de flavonoides totais em quercetina em porcentagem (%) de amostra seca; C = concentração; d = densidade do extrato (g/mL)

#### Análise estatística

As regiões foram comparadas, inicialmente, em relação a cada característica em estudo por ANOVA *one-way* para a comparação das médias, e esta técnica não produziu um modelo significativo para algumas características (umidade, resíduo mineral fixo, cera, massa mecânica, sólidos solúveis em etanol e fenólicos totais). Aplicou-se, então, o teste não paramétrico equivalente, o teste de mediana de Mood, que apresenta

um intervalo de confiança de 5% para a mediana de cada região, tornando possível a ordenação das mesmas. Para a análise de índice de oxidação e flavonoides totais, os dados foram tratados por meio de ANOVA *one-way*, seguido de testes de comparação múltipla (teste de Tukey) para identificação dos contrastes significativos. Em todas as análises estatísticas considerou-se um nível de significância de 0,05 na tomada de decisões<sup>22</sup>. Os cálculos foram realizados utilizando-se o software estatístico MINITAB 14.1.0 (Minitab Inc.)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinações quantitativas

O resultado das determinações de umidade, resíduo mineral fixo, cera, massa mecânica, fenólicos totais, flavonoides totais, substâncias solúveis em etanol e índice de oxidação está disposto nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, distribuídos conforme a região do país onde foram coletadas as amostras.

Em relação ao teor de umidade, o teste de Mood apontou diferenças significativas entre algumas regiões (valor-p = 0,000). A região Nordeste (NE) foi estatisticamente semelhante à região Sul (SU), cujas medianas foram, respectivamente, 4,54% e 4,48%, e o mesmo ocorreu entre as regiões Sudeste (SE) e Centro-Oeste (CO), respectivamente 6,30% e 6,64%. Entre todas as amostras analisadas, apenas a procedente do município de Santa Teresina (NE) apresentou umidade acima do limite máximo de 8% estabelecido em legislação<sup>1</sup>. Variações no teor de umidade podem estar relacionadas ao local onde a própolis é depositada dentro da colmeia, pois é possível que quanto maior o contato

**Tabela 2.** Determinações quantitativas em amostras de própolis da região Nordeste e limites estabelecidos pelo MAPA

Município	Umidade (%m/m)	RMF (%m/m)	Cera (%m/m)	MM (%m/m)	SSE (%m/m)	IO (segundos)	Fenólicos Totais (%)	Flavonoides Totais (mg/g)
Mucuri	3,61 ± 0,02	1,70 ± 0,05	9,04 ± 0,10	28,35 ± 0,19	42,90 ± 0,30	4,67 ± 0,58	9,72 ± 0,27	3,84 ± 0,10
Irecê	4,30 ± 0,02	2,84 ± 0,05	11,50 ± 0,16	31,50 ± 0,10	45,70 ± 0,36	5,67 ± 0,58	7,60 ± 0,10	21,85 ± 0,10
Palmeras	4,29 ± 0,03	2,27 ± 0,07	12,43 ± 0,40	32,76 ± 0,25	47,50 ± 0,42	4,67 ± 0,58	5,09 ± 0,23	9,24 ± 0,31
Lençóis	4,55 ± 0,05	2,54 ± 0,11	9,20 ± 0,30	38,50 ± 0,30	35,82 ± 0,24	6,33 ± 0,58	2,77 ± 0,22	1,30 ± 0,09
João Câmara	4,50 ± 0,02	3,07 ± 0,09	6,56 ± 0,19	29,15 ± 0,25	46,73 ± 0,28	7,33 ± 0,58	3,43 ± 0,25	24,28 ± 0,16
São Luiz	2,96 ± 0,04	18,70 ± 0,26	2,92 ± 0,11	56,81 ± 0,28	36,11 ± 0,15	3,67 ± 0,58	0,95 ± 0,09	0,36 ± 0,04
Santa Terezinha	9,89 ± 0,09	2,09 ± 0,07	11,80 ± 0,26	29,45 ± 0,27	62,50 ± 0,37	3,00 ± 0,00	29,52 ± 0,20	33,15 ± 0,24
João Pessoa	2,26 ± 0,05	3,50 ± 0,10	8,85 ± 0,30	26,80 ± 0,26	54,79 ± 0,24	4,33 ± 0,58	27,50 ± 0,36	23,07 ± 0,16
Requisitos em Legislação	Máximo 8%	Máximo 5%	Máximo 25%	Máximo 40%	Mínimo 35%	Máximo 22 seg	Mínimo 5%	Mínimo 0,5% ou 5 mg/g

Média ± desvio padrão de três determinações; RMF: resíduo mineral fixo; MM: massa mecânica; SSE: substâncias solúveis em etanol; IO: índice de oxidação.

**Tabela 3.** Determinações quantitativas em amostras de própolis da região Sudeste e limites estabelecidos pelo MAPA

Município	Umidade (%m/m)	RMF (%m/m)	Cera (%m/m)	MM (%m/m)	SSE (%m/m)	IO (segundos)	Fenólicos Totais (%)	Flavonoides Totais (mg/g)
Barbacena	6,30 ± 0,04	2,91 ± 0,07	7,47 ± 0,22	29,65 ± 0,10	56,87 ± 0,15	7,33 ± 0,58	7,89 ± 0,29	49,83 ± 0,15
Itabira	6,30 ± 0,03	2,90 ± 0,05	8,36 ± 0,14	30,54 ± 0,10	54,38 ± 0,18	6,33 ± 0,58	8,37 ± 0,26	43,87 ± 0,16
Lavras	6,19 ± 0,01	2,85 ± 0,06	8,33 ± 0,15	29,82 ± 0,10	58,07 ± 0,15	6,00 ± 0,00	10,88 ± 0,21	49,30 ± 0,20
Patrocínio	6,20 ± 0,02	2,90 ± 0,04	7,41 ± 0,21	29,89 ± 0,18	56,48 ± 0,14	5,33 ± 0,58	15,76 ± 0,24	49,41 ± 0,25
Juiz de Fora	5,75 ± 0,01	3,03 ± 0,09	7,65 ± 0,19	33,60 ± 0,10	56,48 ± 0,25	7,00 ± 0,00	19,43 ± 0,21	45,93 ± 0,15
Salesópolis	6,20 ± 0,04	2,83 ± 0,05	7,36 ± 0,15	33,16 ± 0,17	60,81 ± 0,21	8,00 ± 0,00	9,55 ± 0,27	25,05 ± 0,09
Barra do Chapéu	7,00 ± 0,01	2,79 ± 0,06	6,80 ± 0,14	31,23 ± 0,20	61,04 ± 0,15	4,67 ± 0,58	11,31 ± 0,36	38,60 ± 0,15
Paraíba	6,40 ± 0,02	1,95 ± 0,05	9,33 ± 0,17	33,51 ± 0,11	61,59 ± 0,14	9,33 ± 0,58	8,82 ± 0,26	39,70 ± 0,15
Cajamar	5,44 ± 0,01	2,80 ± 0,04	6,79 ± 0,13	33,37 ± 0,19	62,14 ± 0,18	7,67 ± 0,58	12,15 ± 0,20	41,69 ± 0,18
Pilar do Sul	6,20 ± 0,03	2,60 ± 0,09	9,30 ± 0,13	30,33 ± 0,23	63,32 ± 0,21	6,00 ± 0,00	8,12 ± 0,22	42,40 ± 0,14
Itaboraí	7,51 ± 0,01	3,26 ± 0,05	7,76 ± 0,08	31,13 ± 0,12	61,10 ± 0,20	8,00 ± 0,00	11,95 ± 0,29	52,70 ± 0,14
Paraíba do Sul	6,13 ± 0,02	2,76 ± 0,05	7,41 ± 0,18	30,61 ± 0,14	58,93 ± 0,14	9,00 ± 0,00	11,20 ± 0,23	45,41 ± 0,12
Requisitos em Legislação	Máximo 8%	Máximo 5%	Máximo 25%	Máximo 40%	Mínimo 35%	Máximo 22 seg	Mínimo 5%	Mínimo 0,5% ou 5 mg/g

Média ± desvio padrão de três determinações; RMF: resíduo mineral fixo; MM: massa mecânica; SSE: substâncias solúveis em etanol; IO: índice de oxidação.

**Tabela 4.** Determinações quantitativas em amostras de própolis da região Sul e limites estabelecidos pelo MAPA

Município	Umidade (%m/m)	RMF (%m/m)	Cera (%m/m)	MM (%m/m)	SSE (%m/m)	IO (segundos)	Fenólicos Totais (%)	Flavonoides Totais (mg/g)
São José da Boa Vista	5,33 ± 0,10	2,91 ± 0,08	5,49 ± 0,15	34,96 ± 0,10	56,22 ± 0,17	5,33 ± 0,58	12,19 ± 0,16	38,51 ± 0,13
São Mateus do Sul	5,26 ± 0,04	2,37 ± 0,08	5,87 ± 0,12	32,65 ± 0,12	54,93 ± 0,13	4,00 ± 0,00	10,48 ± 0,22	18,12 ± 0,08
Wenceslau Brás	5,23 ± 0,02	3,24 ± 0,10	6,20 ± 0,20	30,40 ± 0,21	57,06 ± 0,12	4,67 ± 0,58	10,68 ± 0,20	40,70 ± 0,10
Ivaí	5,35 ± 0,03	3,43 ± 0,08	6,55 ± 0,23	32,29 ± 0,20	56,00 ± 0,18	3,00 ± 0,00	12,80 ± 0,17	30,90 ± 0,11
Içara	3,49 ± 0,02	2,42 ± 0,08	10,00 ± 0,12	30,66 ± 0,16	50,87 ± 0,15	7,33 ± 0,58	10,49 ± 0,33	3,91 ± 0,15
Anitápolis	3,27 ± 0,03	2,02 ± 0,09	8,56 ± 0,15	27,86 ± 0,10	51,51 ± 0,10	5,67 ± 0,58	5,15 ± 0,27	7,47 ± 0,14
Itajaí	6,45 ± 0,06	2,77 ± 0,08	10,61 ± 0,28	29,65 ± 0,24	43,83 ± 0,24	3,00 ± 0,00	7,20 ± 0,28	24,03 ± 0,08
Araranguá	3,22 ± 0,07	2,55 ± 0,06	10,35 ± 0,28	29,22 ± 0,25	50,11 ± 0,14	5,33 ± 0,58	5,80 ± 0,28	24,67 ± 0,20
Pelotas	2,58 ± 0,03	1,70 ± 0,05	6,34 ± 0,16	31,72 ± 0,14	57,54 ± 0,10	10,00 ± 0,00	5,91 ± 0,26	14,50 ± 0,09
Taquara	4,60 ± 0,02	1,56 ± 0,06	7,12 ± 0,13	28,82 ± 0,20	58,07 ± 0,12	9,00 ± 0,00	5,27 ± 0,27	14,48 ± 0,06
Requisitos em Legislação	Máximo 8%	Máximo 5%	Máximo 25%	Máximo 40%	Mínimo 35%	Máximo 22 seg	Mínimo 5%	Mínimo 0,5% ou 5 mg/g

Média ± desvio padrão de três determinações; RMF: resíduo mineral fixo; MM: massa mecânica; SSE: substâncias solúveis em etanol; IO: índice de oxidação.

**Tabela 5.** Determinações quantitativas em amostras de própolis da região Centro Oeste e limites estabelecidos pelo MAPA

Município	Umidade (%m/m)	RMF (%m/m)	Cera (%m/m)	MM (%m/m)	SSE (%m/m)	IO (segundos)	Fenólicos Totais (%)	Flavonoides Totais (mg/g)
Campo Grande	7,66 ± 0,06	3,26 ± 0,09	5,62 ± 0,15	31,90 ± 0,20	56,40 ± 0,20	3,67 ± 0,58	13,22 ± 0,24	41,14 ± 0,12
Mundo Novo	7,17 ± 0,06	3,60 ± 0,04	12,23 ± 0,25	35,22 ± 0,22	41,43 ± 0,31	2,33 ± 0,58	5,89 ± 0,24	14,78 ± 0,14
Angélica	5,13 ± 0,06	3,51 ± 0,07	14,67 ± 0,41	37,10 ± 0,23	38,56 ± 0,20	4,00 ± 0,00	5,37 ± 0,25	5,30 ± 0,17
Requisitos em Legislação	Máximo 8%	Máximo 5%	Máximo 25%	Máximo 40%	Mínimo 35%	Máximo 22 seg	Mínimo 5%	Mínimo 0,5% ou 5 mg/g

Média ± desvio padrão de três determinações; RMF: resíduo mineral fixo; MM: massa mecânica; SSE: substâncias solúveis em etanol; IO: índice de oxidação.

com o ambiente externo, maior a influência deste sobre o teor de água da própolis, resultando em maior ou menor umidade<sup>23</sup>.

Funari e Ferro<sup>24</sup> observaram, em própolis do município de Cabreúva (SP), teores de umidade variando de 10,86% a 11,00%. É necessário considerar que os autores fizeram uso do método de secagem convencional, em estufa a 105 °C, e relacionaram os resultados não apenas à perda de água, mas também à perda de compostos aromáticos. Segundo Melo e Almeida-Muradian<sup>14</sup> o método de análise empregado para determinar esse parâmetro influencia no resultado final. As pesquisadoras compararam cinco métodos gravimétricos (estufa convencional a 100 °C, estufa a vácuo a 70 °C, dessecador com ácido sulfúrico, secagem por radiação infravermelha e liofilização) e um volumétrico (titulação Karl Fisher) para determinar a umidade em amostras de pólen apícola desidratado, encontrando valores que variaram significativamente de acordo com o método. A secagem por radiação infravermelha foi considerada a maneira mais precisa para determinar a umidade das amostras.

O resíduo mineral fixo evidencia o grau de substâncias residuais não voláteis presentes na própolis, sendo o limite máximo estabelecido em legislação de 5%<sup>1</sup>. Cunha et al.<sup>25</sup> analisaram amostras de São Paulo e Minas Gerais e observaram valores de 3,80% a 4,23% e 2,55% a 3,25%, respectivamente; enquanto Silva et al.<sup>26</sup> encontraram valores de 1,13% a 1,70% em amostras colhidas na cidade de Areia, no estado da Paraíba. Entre as regiões, com base no teste de Mood, a mediana dos valores variou estatisticamente (valor-p = 0,004), havendo igualdade estatística apenas entre amostras procedentes do NE, SE e SU, respectivamente 2,57%, 2,80% e 2,50%, que diferiram significativamente das amostras procedentes do CO (3,47%). Apenas a própolis procedente da cidade de São Luiz (NE) mostrou teor de resíduo mineral fixo acima do limite máximo estabelecido pelo MAPA, o que pode indicar contaminação por terra, areia ou outros resíduos, que pode ter ocorrido durante a coleta e manipulação do produto.

O teor de cera variou significativamente entre algumas regiões pelo teste de Mood (valor-p = 0,012). As medianas das amostras procedentes do NE e CO, respectivamente 9,03% e 10,84%, foram semelhantes estatisticamente, e as medianas das amostras procedentes do SU e SE, respectivamente 7,71% e 7,83%, também. Gregório<sup>27</sup> determinou o teor de cera em amostras de própolis da cidade de Cajuru (SP) e encontrou valores

de 7,44 a 15,76%, enquanto Funari e Ferro<sup>24</sup> encontraram média de apenas 2,25% de cera em amostras provenientes da Serra do Japi (SP), valor próximo ao observado na própolis da cidade de São Luiz (2,92%). Bastos<sup>28</sup> observou valores de 20,86 a 35,53% em amostras provenientes de Minas Gerais, e Bastos et al.<sup>29</sup> valores de 3,4 a 74,6% em amostras coletadas na região sudoeste de Mato Grosso. As abelhas podem incorporar mais cera à própolis durante os períodos em que as resinas são escassas ou de difícil coleta, e períodos em que a vedação da colmeia deve ser maior, como no inverno<sup>23,26</sup>. Quantidade elevada de cera é a principal causa de turvação dos extratos de própolis, quando armazenados em baixas temperaturas<sup>19</sup>. Além disso, quanto maior o teor de cera, menor o teor de demais substâncias, como resinas e bálsamos, onde são encontrados os compostos bioativos<sup>24</sup>.

O teor de massa mecânica refere-se às partículas incorporadas à própolis durante o beneficiamento pelas abelhas ou no processo de retirada das colmeias (fragmentos de folhas, pedaços de insetos)<sup>30</sup>. Pelo teste de Mood não houve igualdade entre as medianas das regiões (valor-p = 0,014). A região SE apresentou mediana estatisticamente semelhante às das regiões NE e SU, respectivamente 31,40%, 34,16% e 30,82%, enquanto as medianas observadas nas regiões NE e SU foram significativamente menores a mediana da região CO (34,74%). Matsuda<sup>17</sup> e Bastos<sup>28</sup> avaliaram o teor de massa mecânica em amostras de própolis provenientes de Minas Gerais e encontraram valores de 28,90 a 30,30% e 22,25 a 40,73%, respectivamente. Funari e Ferro<sup>24</sup> encontraram valor médio de 35,22% em amostras provenientes da Serra do Japi (SP). A legislação brasileira estipula valor máximo de 40% para este parâmetro<sup>1</sup>, de modo que a própolis de São Luiz (NE) foi a única a ser classificada fora do padrão.

Em relação ao teor de substâncias solúveis em etanol, entre algumas regiões avaliadas foram observadas variações pelo teste de Mood (valor-p = 0,000). A região NE, cuja mediana foi de 46,51%, diferiu significativamente das regiões SE e SU, respectivamente 59,27% e 53,62%, porém foi estatisticamente semelhante à região CO (45,46%). A região SE apresentou mediana superior e estatisticamente diferente das demais regiões. Estudos indicam que alguns compostos bioativos são solúveis em etanol<sup>12,31</sup>, de modo que o interesse é por própolis com elevados teores desse parâmetro em razão de um maior potencial terapêutico. Ikegaki<sup>21</sup> analisou amostras de própolis provenientes da região do Sul do Brasil, encontrando valores que variaram de 54,5 a

60,5%. Alencar<sup>32</sup>, avaliando amostras provenientes da região Nordeste e Sudeste, encontrou valores de 24,1 a 61,0%, respectivamente.

O índice de oxidação é um parâmetro frequentemente utilizado para sugerir o tempo decorrido desde a colheita da própolis, o tipo de armazenamento e a atividade antioxidante da amostra. Altos índices de oxidação em própolis indicam longo período de armazenamento em temperaturas elevadas, seja no interior da colmeia ou em depósitos de armazenamento<sup>33</sup>, de modo que a legislação em vigor limita o índice em até 22 segundos. Com o teste de Tukey, pode-se verificar variações significativas (valor-p = 0,000), com exceção à região NE, cuja média (4,96%) foi estatisticamente semelhante à região SU (5,73%). A média do índice de oxidação na região SE foi de 7,05%, enquanto na região CO foi de apenas 3,33%. Bastos<sup>28</sup> avaliou o índice de oxidação de amostras provenientes de Minas Gerais e encontrou valores de 3,3 a 40,6 s.

Pelo teste de Mood pode-se verificar que, dada a dispersão de valores, o teor de compostos fenólicos nas quatro regiões foi estatisticamente igual (valor-p = 0,092), sendo NE = 9,72%; SE = 11,28%; SU = 8,60%; e CO = 8,16%. A legislação brasileira estabelece limite mínimo de 5% de compostos fenólicos em própolis, e nota-se que, em algumas amostras, os valores encontrados ficaram muito acima desse limite, como nas amostras de Santa Terezinha (NE) (29,52%) e João Pessoa (NE) (27,50%), sendo possível inferir maior atividade biológica a essas amostras. Os compostos fenólicos fazem parte de um grupo de compostos chamados de bioativos, substâncias não sintetizadas pelo organismo humano e que, quando presentes na dieta em quantidades significativas, contribuem para a prevenção de doenças graves, como alguns tipos de câncer, cardiopatias, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias<sup>34,35</sup>. Cunha et al.<sup>25</sup>, avaliando amostras de própolis provenientes de Sorocaba (SP), encontraram valor médio de 8,53%, enquanto Funari e Ferro<sup>24</sup> encontraram valor médio de 7,39% de fenólicos totais.

Quanto ao teor de compostos flavonoides, uma das classes mais estudadas de compostos fenólicos, o teste de Mood revelou a região SE com mediana estatisticamente superior as demais regiões (43,66 mg/g), enquanto as medianas das regiões NE (14,64 mg/g), SU (21,73 mg/g) e CO (20,41 mg/g), dada a dispersão dos dados, foram estatisticamente semelhantes. Nota-se que, na amostra

de São Luiz, onde foram encontrados os maiores teores de cera e resíduo mineral fixo, foram encontrados os menores teores de compostos fenólicos e flavonoides, de modo que pode-se inferir à essa amostra a menor atividade biológica entre as trinta e três analisadas. É necessário considerar que o método utilizado quantifica o teor de flavonoides com base em quercetina (flavonol), porém as amostras de própolis analisadas podem conter outras classes de flavonoides.

De modo geral, os flavonoides são frequentemente utilizados como marcadores taxonômicos, dada sua abundância relativa no reino vegetal, especificidade em algumas espécies, relativa facilidade de identificação, relativa estabilidade e acúmulo com pouca influência do meio ambiente<sup>36</sup>. Ikegaki<sup>21</sup> analisou amostras do Rio Grande do Sul e do Paraná, obtendo valores de 3,4 a 18,5 mg/g e 1,39 a 11,97 mg/g, respectivamente. Embora a própolis comercializada seja elaborada pela mesma espécie de abelha (*Apis mellifera*), o teor de flavonoides sofre variação com a estação do ano, localização geográfica e origem botânica da própolis<sup>2,3,26</sup>.

### Determinações qualitativas

Os espectros de absorção gerados na determinação qualitativa de compostos fenólicos por espectrofotometria na região ultravioleta-visível (UV-Scanning) variaram de 270 a 315 nm. A análise por espectrofotometria dos EEP fornece uma característica geral de todos os compostos fenólicos presentes na própolis. Como descrito por Markham<sup>37</sup>, os flavonoides também apresentam valores máximos de absorção na faixa de 250 a 350 nm.

Da região NE, as quatro amostras da Bahia apresentaram absorção no valor máximo entre 281 nm e 309 nm; as amostras da Paraíba, entre 271 nm e 281 nm; a amostra do Maranhão, de 278 nm; e a amostra do Rio Grande do Norte, absorção no valor máximo de comprimento de onda de 270 nm. Na região SE, as cinco amostras de Minas Gerais apresentaram absorção no valor máximo entre 303 nm e 312 nm, as cinco amostras de São Paulo entre 310 nm e 313 nm, e as duas amostras do Rio de Janeiro entre 312 nm e 314 nm. Das amostras da região SU, quatro delas, do Paraná, apresentaram absorção no valor máximo entre 301 nm e 308 nm; quatro, de Santa Catarina, entre 272 nm e 315 nm; e duas delas, do Rio Grande do Sul, absorção no valor máximo de comprimento de onda de 270 nm. Na região CO, as três amostras procedentes de Mato Grosso do Sul

apresentaram absorção no valor máximo entre 300 nm e 315 nm.

O teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, os espectros de absorção estão relacionados à origem botânica da própolis. Alencar et al.<sup>38</sup> encontraram absorção máxima de 300 nm em amostras de própolis coletadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e os autores concluíram, ao analisarem o perfil químico das amostras, que a *Baccharis dracunculifolia* foi a principal fonte vegetal para a elaboração da própolis da região sudeste do Brasil, e que a composição da planta influenciou diretamente no teor de compostos fenólicos da própolis. Silva et al.<sup>4</sup>, ao analisarem amostras de própolis coletadas no estado do Alagoas, na região Nordeste do país, observaram absorção máxima de 282 nm e perfil químico indicando a *Dalbergia ecastophyllum* como fonte botânica, perfil este que influenciou no teor de compostos fenólicos e absorção da própolis.

## CONCLUSÃO

Das trinta e três amostras analisadas, somente seis deixaram de atender um ou mais parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos em legislação, sendo cinco amostras da região Nordeste e uma amostra da região Sul. Nessas seis amostras, foram identificados dez parâmetros em desacordo, sendo quatro teores de flavonoides abaixo do limite mínimo de 5 mg/g (Murici/NE, Lençóis/NE, São Luiz/NE, Içara/SU), três teores de fenólicos abaixo do limite mínimo de 5% (Lençóis/NE, João Câmara/NE, São Luiz/NE), um teor de umidade acima de 8% (Santa Terezinha/NE), um mineral fixo acima de 5% (São Luiz/NE) e um teor de cera acima de 40% (São Luiz/NE).

As medianas das amostras da região NE foram estatisticamente semelhantes às amostras da região SU em cinco dos oito parâmetros quantitativos: teor de umidade, massa mecânica, índice de oxidação, fenólicos totais e flavonoides totais. Em amostras da região NE, foram encontrados tanto o maior quanto o menor teor de compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente nas amostras de Santa Terezinha e São Luiz, de modo que se espera maior e menor atividade biológica nessas amostras, respectivamente. O teor de fenólicos foi o único parâmetro cuja mediana foi estatisticamente igual nas amostras das quatro regiões. O teor de flavonoides nas amostras da região sudeste foi bastante superior ao encontrado nas demais regiões.

A análise qualitativa dos compostos fenólicos confirmou a presença de flavonoides, mas há também outros grupos cuja absorção máxima está na faixa entre 270 nm e 315 nm.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida à Ligia Bicudo de Almeida Muradian; e ao Laboratório CETAL, pelo apoio técnico durante a coleta de dados.

---

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 jan 2001. Seção 1, p. 18-23.
2. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005;2(1):33-8.
3. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):114-7.
4. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegali M, Souza VC, Esteves A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(3):313-6.
5. Ghisalberti VQ. Propolis: a review. *Bee World*. 1979;60(2):59-84.
6. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001;74(2):105-12.
7. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 2004; 84(3):329-39.
8. Montpied P. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Mol Brain Res*. 2003;115(2):111-20.
9. Sawaya ACHF, Cunha IBS, Marcucci, MC. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Central J*. 2011;5(27):1-10.
10. Serviço Nacional de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE. Exportação de cera de abelha (própolis), em bruto. [acesso 2011 nov 30]. Disponível em: [http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/exportacoes/Exportacoes%20julho.pdf].
11. Park YK, Koo MH, Sato HH, Contado JL. Estudos de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. *Arq Biol Tecnol*. 1995;38(4):1253-9.
12. Matsuda AH. Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

13. Garcia-Amoedo IH, Almeida-Muradian LB. Comparação de metodologias para determinação de umidade em geleia real. *Quím Nova*. 2002;25(4):676-9.
14. Melo ILP, Almeida-Muradian LB. Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. *Cienc Tecnol Aliment*. 2011;31(1):194-7.
15. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília (DF): Anvisa; 2005.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Decreto nº 78.840, de 25 de novembro de 1976. Aprova a Terceira Edição da Farmacopeia Brasileira e da Outras Providências. Brasília, DF, 6 jan 1977. Seção 1, Suplemento, p. 1.
17. Matsuda AH. Aplicação da técnica de irradiação gama para preservação de própolis. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares; 2002.
18. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honey Bee Sci*. 2000;21(2):85-90.
19. Woisky RG. Métodos químicos para controle de amostras de própolis. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 1996.
20. Marcucci MC. Apostila de análise de própolis. Pindamonhangaba (SP): Instituto de Zootecnia; 1998.
21. Ikegaki M. Determinação de qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2001.
22. Costa Neto PLO. Estatística. São Paulo: Edgard Blücher; 1977.
23. Franco SL, Bruschi ML, Moura LPA, Bueno JHF. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. *Rev Bras Farmacogn*. 2000;9-10(1):1-10.
24. Funari CS, Ferro VO. Análise de própolis. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006;26(1):171-8.
25. Cunha IBS, Awaya ACH, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza TE, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc*. 2004;15(6):964-70.
26. Silva RA, Rodrigues AE, Ribeiro MCM, Custódio AR, Andrade NED, Pereira WE. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Cienc Rural*. 2006;36(6):1842-8.
27. Gregório L.E. Influência da sazonalidade na composição polínica, no perfil químico e na atividade antimicrobiana da própolis produzida em Cajuru-SP. [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2003.
28. Bastos EMAF. Origem botânica e indicadores de qualidade da "própolis verde" produzida no Estado de Minas Gerais. [tese de doutorado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2001.
29. Bastos EMAF, Galbiati C, Loureiro EM, Scoaris DO. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63(5):1255-9.
30. Warakomska Z, Maciejewicz W. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. *Apidologie*. 1992;23:277-83.
31. Marston A, Hostettmann K. Separation and quantification of flavonoids. In: Andersen OM, Markham KR, organizador. *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. Londres: Taylor and Francis, 2006. p. 1-36.
32. Alencar SM. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.
33. Asis, M. Propóleo, el oro púrpura de las abejas. La Havana: Centro de Información y Documentación Agropecuária; 1989.
34. Carratu E, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali dell' Instituto Superiore di Sanità*. 2005;41(1):7-16.
35. Horst MA, Lajolo FM. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. [acesso 2011 abr 12]. Disponível em: [http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Biodisponibilidade.pdf].
36. Zuanazzi JAS. Flavonoides. In: Simões, CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, organizadores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre (RS): UFRG; 1999. p. 489-516.
37. Markham KR. Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. In: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H. *The flavonoids*. Nova York: Academic Press; 1975. p. 47-61.
38. Alencar SM, Aguiar CL, Paredes-Guzmán J, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Cienc Rural*. 2005;35(4):909-15.



## Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos

### Evaluation of the microbiological contamination in herbal medicines

RIALA6/1502

Sarah de Miranda FARIA, Hilda do Nascimento NÓBREGA, Joana Angélica Barbosa FERREIRA,  
Victor Augustus MARIN\*

\*Endereço para correspondência: Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).  
Rua Dr. Xavier Sigaud, 290, prédio II – 3º andar – Urca, CEP: 22290-180. Rio de Janeiro, RJ. Tel: (21) 2542-7276.  
E-mail: victor.marin@unirio.br  
Recebido: 15.01.2012 – Aceito para publicação: 17.07.2012

#### RESUMO

No presente estudo, foi investigada a qualidade microbiológica de 30 amostras de fitoterápicos derivados de 10 espécies vegetais vendidos em farmácias do Rio de Janeiro. Foram efetuadas as contagens totais de bactérias aeróbias, de bolores e leveduras, de outras enterobactérias e a identificação dos micro-organismos. Foram identificadas 17 espécies de bactérias e duas de fungos. A maioria dos micro-organismos era de agentes oportunistas, indicando que 80% das amostras avaliadas estavam insatisfatórias de acordo com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira. Comparando-se os resultados deste trabalho com os relatados nos estudos anteriores, conclui-se que a contaminação em fitoterápicos é um problema que tem persistido ao longo do tempo, e o seu monitoramento microbiológico fornece base para ações de Vigilância Sanitária. Nesse contexto, o monitoramento desses medicamentos é relevante ferramenta para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia desses produtos.

**Palavras-chaves.** fitoterápicos, controle de qualidade, avaliação microbiológica

#### ABSTRACT

This study investigated the microbiological quality of 30 samples of herbal medicines derived from 10 plant species and sold in pharmacies of Rio de Janeiro. The microbiological analyses were consisted of total counts of aerobic bacteria, molds, yeasts and other enterobacteria, and microorganisms identification. Seventeen bacteria and two fungi species were identified, and the majority of them were opportunistic pathogens, demonstrating that 80% of the analyzed samples were noncompliant with the limits established by the Brazilian Pharmacopoeia. By comparing these results with those previously reported, it was evidenced that the microbiological contamination in herbal medicines has been a persisting problem over time. Thus, the microbiological monitoring is a rationale for health surveillance actions. In this context, it is crucial to monitor the herbal medicines for assuring the quality, the safety and the efficacy of these products.

**Keywords.** herbal medicines, quality control, microbiological evaluation.

## INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos têm sido utilizados desde a antiguidade para o tratamento de uma gama de enfermidades. Referências históricas descrevem o uso de plantas medicinais em praticamente todas as antigas civilizações, sendo a primeira encontrada na obra chinesa *Pen Ts'ao* (“A grande fitoterapia”), de Shen Nung, que remonta a 2800 a.C.<sup>1</sup>. É seguro dizer que entre 25% e 50% dos medicamentos atualmente comercializados tem origem nos produtos naturais<sup>2</sup>.

Por definição, denominam-se plantas medicinais aquelas que são tradicionalmente utilizadas pela população para prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Após passarem por processamento dão origem a um tipo especial de medicamento, os fitoterápicos<sup>3</sup>. De acordo com a legislação sanitária, fitoterápicos são medicamentos produzidos utilizando exclusivamente matérias-primas ativas vegetais (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros) e caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso. Como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. Dessa classe de medicamentos excluem-se os que, em sua composição, contenham substâncias ativas isoladas, de qualquer origem e as associações destas com extratos vegetais<sup>4</sup>.

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 50 mil espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta), mais de 500 espécies de mamíferos, cerca de 3 mil espécies de peixes, mais de 1.500 espécies de pássaros, mais de 500 espécies de anfíbios e milhões de espécies de insetos e micro-organismos. Em função disso, e sobretudo pela grande tradição do uso das plantas na medicina popular no Brasil, o interesse pelos estudos das propriedades medicinais das plantas vem sendo explorado extensivamente pelos pesquisadores brasileiros e, mais recentemente, pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos<sup>5</sup>.

Anualmente, no mundo, essa modalidade terapêutica movimentava cerca de 22 bilhões de dólares<sup>6</sup>. No Brasil, no período de novembro de 2003 a outubro de 2006, o mercado de fitoterápicos faturou R\$ 1.840.228.655,00 com a venda de 122.696.549 unidades farmacêuticas. Essas cifras refletem o grande volume de vendas devido ao custo reduzido, ausência de patente e à

preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”. Contudo, ao contrário da crença popular, que atribui às preparações fitoterápicas a isenção a efeitos colaterais, seu consumo pode conduzir a efeitos adversos à saúde, tais como: reações alérgicas, tóxicas, efeitos mutagênicos e interações medicamentosas<sup>7-10</sup>.

Em virtude da expressividade desse comércio, em junho de 2006, o Presidente brasileiro sancionou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem por objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional<sup>11</sup>. No ano de 2009, o Ministério da Saúde incluiu 71 plantas medicinais à lista de espécies que poderão ser utilizadas como medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde, o SUS<sup>12</sup>.

Porém, a segurança e eficácia dos produtos fitoterápicos sofrem influência de vários fatores que incluem: matéria-prima, controle do processamento, forma farmacêutica, bula, embalagem e propaganda. O aumento da demanda, associado à falta de fiscalização no processo produtivo resulta, muitas vezes, em medicamentos sem condições adequadas de uso, sem garantia da qualidade, segurança e eficiência fundamentais para a recuperação ou preservação da saúde do consumidor<sup>7,8,13</sup>. Sobre a análise microbiológica, foi relatado que vários produtos apresentaram níveis de contaminação elevados, tornando seu consumo um problema de saúde pública<sup>13-16</sup>.

Nesse contexto, a vigilância sanitária – por ser o segmento da saúde responsável por eliminar, diminuir ou prevenir os riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção, circulação de bens e prestação de serviços de interesse da saúde – encontra entre suas competências o controle de qualidade de produtos com finalidades terapêuticas<sup>17</sup>. A qualidade microbiológica de fitoterápicos é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que estabelecem limites máximos da carga microbiana no produto e a ausência de determinados patógenos<sup>18</sup>.

Assim, este estudo destinou-se a contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a qualidade dos fitoterápicos comercializados no Brasil, com relevância para o Sistema Único de Saúde, avaliando microbiologicamente os fitoterápicos na forma medicamentosa, utilizando-se como parâmetros a contagem total de bactérias aeróbias, contagem de

bolores e leveduras, contagem total de enterobactérias e a identificação dos micro-organismos isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem foi realizada a partir de fitoterápicos comercializados em farmácias e drogarias localizadas no estado do Rio de Janeiro. Trinta amostras de fitoterápicos foram selecionadas com base na Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)<sup>12</sup>, sendo que as espécies vegetais foram escolhidas com base nos critérios de maior número de unidades farmacêuticas comercializadas no ano de 2006<sup>19</sup> e número de registros na Anvisa no ano de 2008<sup>3</sup>: *Cynara scolymus* (alcachofra), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), *Glycine max* (soja), *Maytenus spp.* (espinheira-santa), *Mikania spp.* (guaco), *Passiflora spp.* (maracujá), *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo), *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada), *Salix alba* (salgueiro-branco) e *Mentha spp.* (hortelã). Para cada espécie vegetal, foram coletadas amostras nas formas farmacêuticas de cápsulas, comprimidos, soluções e suspensões, de acordo com a disponibilidade no mercado.

A metodologia foi utilizada em concordância com a Farmacopeia Brasileira<sup>20,21</sup>. Para a contagem bacteriana, foram feitas diluições até 10<sup>-5</sup>. Alíquotas de 1 mL de cada diluição da amostra foram transferidas para placas de Petri, em duplicata e adicionados 15-20 mL de ágar de caseína-soja previamente resfriado a 45-50 °C. Após homogeneização por movimentos rotatórios e solidificação do ágar, as placas foram invertidas e incubadas a 30-35 °C por 48 horas. Nos casos em que o crescimento não foi observado, a incubação foi prolongada por mais 48 horas.

Para a contagem de fungos, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri em duplicata e adicionados 15-20 mL de ágar Sabouraud-dextrose ou ágar batata-dextrose a 45-50 °C. Após homogeneizar e solidificar o meio, as placas foram invertidas e incubadas a temperatura de 20-25 °C por 5 a 7 dias.

Para a identificação de micro-organismos, foram inoculados 10 mL ou 10 g da amostra em caldo caseína-soja e em caldo lactosado, que foram incubados a 35 ± 2 °C durante um período de 24 a 48 horas. A partir do caldo lactosado, realizou-se: a) esgotamento em ágar MacConkey para a pesquisa de *Escherichia coli* e outras enterobactérias, sendo as placas incubadas a 35 ± 2 °C por 24 a 48 horas; e b) alíquotas de 1 mL foram transferidas para caldo selenito cistina e para caldo Tetrionato suplementado com 0,1 mL

de verde brilhante e 0,2 mL de iodeto de potássio, para a detecção *Salmonella* spp. Esses caldos foram incubados 35 ± 2 °C por 24 a 48 horas. Quando verificado crescimento, as colônias foram isoladas em placas de ágar xilose-lisina desoxicolato (XLD), ágar verde brilhante-vermelho de fenol lactose-sacarose (BPLS) e ágar bismuto-sulfito (ASB). O caldo lactosado também foi utilizado para pesquisa de outras enterobactérias, com transferência de 1 mL para caldo mossel e, em seguida, foram feitas diluições até 1:1000, sendo que as diluições foram plaqueadas imediatamente em ágar cristal vermelho violeta neutro bile glicose (VRBG). Quando verificado algum crescimento nas diluições 1:10 e 1:100, as amostras eram reprovadas, pois indicava que possuíam contagens de enterobactérias superiores ao limite máximo estabelecido (100 UFC por 1 grama de produto).

A partir do caldo caseína-soja, foram realizados o plaqueamento em ágar cetrimida (específico para *Pseudomonas aeruginosa*), ágar Vogel-Johnson (específico para *Staphylococcus aureus*) e ágar caseína-soja (para pesquisa de outros micro-organismos). As placas foram incubadas 35 ± 2 °C durante um período de 24 horas.

Os testes bioquímicos realizados seguiram a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira<sup>20</sup>. Para bastonetes Gram negativos (fermentadores), foi realizada a triagem por meio da fermentação da glicose, verificação da motilidade e oxidase. Seguiram-se as provas de utilização do citrato; descarboxilação da arginina, ornitina e lisina; produção de acetoina (prova de VP-Voges Proskauer); produção de H<sub>2</sub>S; gás na glicose com tubo de Durhan; oxidação da xilose, manitol, arabinose, trealose, sacarose, inositol, ramnose, sorbitol, salicina; redução do nitrato; indol; e hidrólise da ureia.

Para bastonetes Gram negativos (não fermentadores), a triagem foi realizada pela não fermentação da glicose e produção da enzima oxidase. Provas bioquímicas realizadas foram: utilização do citrato; liquefação da gelatina; não fermentação dos açúcares (glicose, sacarose, manitol, frutose, rhamnose, trehalose, xilose, galactose, manose e lactose); hidrólise da ureia; hidrólise da esculina, crescimento em 6% e 6,5% de NaCl; descarboxilação da arginina, ornitina e lisina; e redução do nitrato.

Cocos Gram positivos foram selecionados da triagem por meio da glicose e catalase. As provas efetuadas foram: fermentação da frutose, manitol, rafinose, manose, sacarose, xilose, teralose, maltose; hidrólise da ureia; descarboxilação da arginina; produção

de acetina (VP) e VM (vermelho de metila); produção da enzima coagulase; e redução do nitrato a nitrito.

Os bastonetes Gram positivos foram selecionados pela triagem efetuada por meio da catalase. As provas efetuadas foram: utilização do citrato; utilização do D-manitol, D- xilose, D- glicose, D- arabinose; produção de acetoína em pH menor que 6 e pH maior que 7 (prova de VP-Voges Proskauer); observação da fermentação da glicose com produção de gás por meio do tubo de Durhan; crescimento em caldo nutriente com 2%, 5%, 7% e 10% de NaCl; crescimento na presença de lisozima, lecitinase (egg-yolk); tirosina; decomposição da caseína (milk-agar); hidrólise do amido; motilidade; redução do nitrato; indol; desaminação da fenilalanina; e liquefação da gelatina.

A pesquisa de *Candida albicans* abrangeu a verificação das características morfológicas das culturas, pela observação microscópica em corante azul de algodão lactofenol, seguida de identificação das culturas que apresentarem células redondas, ovaladas e com brotamento, por provas bioquímicas complementares.

A identificação de *Aspergillus parasiticus* foi realizada a partir das placas de ágar Sabouraud-dextrose ou ágar batata-dextrose, utilizadas na contagem de fungos. O desenvolvimento de colônias grandes com crescimento radial, micélio aéreo de coloração inicialmente branca, tornando verde-oliva foram submetidas a observações macro e micromorfológicas que identificam os fungos filamentosos e pesquisa de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação<sup>20</sup>.

**Tabela 1.** Contagem dos micro-organismos detectada em amostras de fitoterápicos

Classificação das amostras	Fitoterápico	Forma farmacêutica	Bactérias aeróbias totais (UFC/g ou mL)	Bolores e leveduras (UFC/g ou mL)	Enterobactérias (UFC/g ou mL)
1	<i>Cynara scolymus</i>	cápsulas	$1,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	<10
2	<i>Cynara scolymus</i>	comprimidos	$4,1 \times 10^6$	<10	>10 <sup>3</sup>
3	<i>Cynara scolymus</i>	solução	<10	<10	<10
4	<i>Harpagophytum procumbens</i>	cápsulas	<10	<10	<10
5	<i>Harpagophytum procumbens</i>	comprimidos	<10	<10	<10
6	<i>Harpagophytum procumbens</i>	cápsulas	$3,0 \times 10^9$	<10	>10 <sup>3</sup>
7	<i>Glycine max</i>	cápsulas	<10	<10	<10
8	<i>Glycine max</i>	comprimidos	$2,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^2$	>10 <sup>3</sup>
9	<i>Glycine max</i>	cápsulas	$6,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^2$	>10 <sup>3</sup>
10	<i>Maytenus spp.</i>	cápsulas	$4,3 \times 10^6$	<10	>10 <sup>3</sup>
11	<i>Maytenus spp.</i>	comprimidos	$3,8 \times 10^9$	<10	>10 <sup>3</sup>
12	<i>Maytenus spp.</i>	solução	<10	$2,0 \times 10^3$	<10
13	<i>Mentha spp.</i>	cápsulas	$1,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^2$	>10 <sup>3</sup>
14	<i>Mentha spp.</i>	comprimidos	$2,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	>10 <sup>3</sup>
15	<i>Mentha spp.</i>	solução	$1,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	>10 <sup>3</sup>
16	<i>Mikania spp.</i>	cápsulas,	<10	<10	<10
17	<i>Mikania spp.</i>	comprimidos	$2,0 \times 10^8$	<10	>10 <sup>3</sup>
18	<i>Mikania spp.</i>	solução	<10	<10	<10
19	<i>Passiflora spp.</i>	cápsulas	$4,0 \times 10^8$	<10	>10 <sup>3</sup>
20	<i>Passiflora spp.</i>	comprimidos	$9,8 \times 10^9$	<10	<10
21	<i>Passiflora spp.</i>	solução	$9,6 \times 10^8$	<10	<10
22	<i>Uncaria tomentosa</i>	cápsulas	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3$	>10 <sup>3</sup>
23	<i>Uncaria tomentosa</i>	comprimidos	$2,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^3$	>10 <sup>3</sup>
24	<i>Uncaria tomentosa</i>	solução	$3,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^2$	>10 <sup>3</sup>
25	<i>Rhamnus purshiana</i>	cápsulas	$2,0 \times 10^7$	<10	>10 <sup>3</sup>
26	<i>Rhamnus purshiana</i>	comprimidos	$8,0 \times 10^8$	<10	>10 <sup>3</sup>
27	<i>Rhamnus purshiana</i>	cápsula	<10	<10	<10
28	<i>Salix alba</i>	cápsulas	$2,3 \times 10^8$	<10	>10 <sup>3</sup>
29	<i>Salix alba</i>	comprimidos	$3,4 \times 10^8$	<10	>10 <sup>3</sup>
30	<i>Salix alba</i>	solução	$5,4 \times 10^7$	<10	>10 <sup>3</sup>

**Tabela 2.** Identificação dos micro-organismos isolados em amostras de fitoterápicos

Amostras	Fitoterápico	Forma Farmacêutica	Micro-organismos
1	<i>Cynara scolymus</i>	cápsulas	<i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
2	<i>Cynara scolymus</i>	comprimidos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
3	<i>Cynara scolymus</i>	solução	ausência
4	<i>Harpagophytum procumbens</i>	cápsulas	ausência
5	<i>Harpagophytum procumbens</i>	comprimidos	ausência
6	<i>Harpagophytum procumbens</i>	cápsulas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Raoultella planticola</i>
7	<i>Glycine max</i>	cápsulas	ausência
8	<i>Glycine max</i>	comprimidos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Cedecea davisae</i>
9	<i>Glycine max</i>	cápsulas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Cedecea davisae</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
10	<i>Maytenus spp.</i>	cápsulas	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Cronobacter saazakii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
11	<i>Maytenus spp.</i>	comprimidos	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
12	<i>Maytenus spp.</i>	solução	<i>Aspergillus parasiticus</i>
13	<i>Mentha spp.</i>	cápsulas	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus circulans</i>
14	<i>Mentha spp.</i>	comprimidos	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Cronobacter saazakii</i> , <i>Bacillus circulans</i>
15	<i>Mentha spp.</i>	solução	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Cronobacter saazakii</i>
16	<i>Mikania spp.</i>	cápsulas	ausência
17	<i>Mikania spp.</i>	comprimidos	<i>Escherichia coli</i>
18	<i>Mikania spp.</i>	solução	ausência
19	<i>Passiflora spp.</i>	cápsulas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
20	<i>Passiflora spp.</i>	comprimidos	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
21	<i>Passiflora spp.</i>	solução	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
22	<i>Uncaria tomentosa</i>	cápsulas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
23	<i>Uncaria tomentosa</i>	comprimidos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
24	<i>Uncaria tomentosa</i>	solução	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
25	<i>Rhamnus purshiana</i>	cápsulas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter saazakii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
26	<i>Rhamnus purshiana</i>	comprimidos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
27	<i>Rhamnus purshiana</i>	cápsula	ausência
28	<i>Salix alba</i>	cápsulas	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i>
29	<i>Salix alba</i>	comprimidos	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
30	<i>Salix alba</i>	solução	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Cedecea davisae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>

## RESULTADOS

Das 30 amostras analisadas, 22 possuíam contaminação por bactérias aeróbias totais, com valores que variavam entre  $10^4$  UFC/g ou mL a  $10^9$  UFC/g ou mL, enquanto nove amostras encontravam-se acima dos padrões preconizados para fungos e leveduras, com contaminação variando entre  $10^2$  UFC/g ou mL a  $10^3$  UFC/g ou mL. Em relação à contagem total de outras enterobactérias, 19 amostras apresentaram contaminação acima de  $10^3$  UFC/g ou mL. Esses resultados encontram-se descritos na Tabela 1.

A identificação bioquímica de bactérias aeróbias, fungos e leveduras detectaram 19 espécies diferentes de micro-organismos, sendo que 17 eram bactérias e duas eram fungos (Tabela 2).

As espécies vegetais *Harpagophytum procumbens*, *Glycine Max* e *Rhamnus purshiana* não estavam disponíveis no mercado na forma de solução ou suspensão. As amostras analisadas foram negativas para *Salmonella spp.* e para *Pseudomonas aeruginosa*. A pesquisa de *Escherichia coli* foi positiva nas amostras 2, 6, 8, 9, 10, 11, 17, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 20 e 30, enquanto

que *Staphylococcus aureus* esteve presente nas amostras 20 e 21. A avaliação de outras enterobactérias mostrou-se insatisfatória para 63,3% das amostras analisadas.

## DISCUSSÃO

Ao compararmos os resultados obtidos neste estudo com outros semelhantes efetuados no Brasil, os percentuais de contaminação foram similares aos encontrados por Fischer<sup>14</sup> em 1992, que detectou uma contaminação bacteriana de 70% e fúngica de 34% em fitoterápicos na forma sólida (cápsulas, comprimidos e pó). Estudo realizado em 2004<sup>22</sup>, na cidade de Piracicaba (SP), que analisou fitoterápicos na forma de cápsulas, obteve contaminação por bactérias um pouco menor, 58%, enquanto a contaminação por bolores e leveduras foi novamente em valores percentuais próximos a 34%. Em relação às contagens, temos resultados semelhantes em relação aos fungos. O estudo referenciado encontrou uma variação de  $10^1$  UFC/g a  $4,2 \times 10^3$  UFC/g, enquanto o presente estudo tem uma variação entre  $1,5 \times 10^2$  UFC/g e  $3,5 \times 10^3$  UFC/g. Porém, as contagens de bactérias aeróbias totais foram significativamente maiores no presente estudo, variando entre  $2,5 \times 10^4$  UFC/g e  $9,8 \times 10^9$  UFC/g, enquanto os produtos pesquisados em 2004 tiveram a contagem variando entre  $10^1$  UFC/g a  $3,4 \times 10^5$  UFC/g<sup>22</sup>.

A comparação desses três estudos brasileiros indica um percentual alto de contaminação dos medicamentos fitoterápicos, sendo verificada a presença de fungos em cerca de 30% das amostras. As cargas de bactérias aeróbias totais tiveram uma maior variação, porém, em todos os estudos, a contaminação das amostras foi superior a 50%, demonstrando uma tendência temporal de elevados índices de contaminação nessa classe de medicamentos.

Ao comparar os resultados das contagens com os limites estabelecidos na Farmacopeia Brasileira<sup>20,21</sup>, constatou-se que 76,6% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos: máximo de 10.000 UFC/g ou mL para contagens de bactérias aeróbias totais, máximo de 100 UFC/g ou mL para bolores e leveduras e máximo de 100 UFC/g ou mL para enterobactérias.

Os limites estabelecidos por outras farmacopeias – como a Americana, a Europeia e a Britânica – possuem os mesmos limites que a Farmacopeia Brasileira, logo, utilizando tais parâmetros, esses produtos possuiriam o mesmo percentual de insatisfatoriedade ao determinado pela presente análise<sup>20,23-25</sup>.

Quanto à identificação de micro-organismos, Fisher identificou *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Porém, é necessário ressaltar que a proposta de trabalho atendia a padrões internacionais da época, que se restringia somente à pesquisa desses micro-organismos<sup>14</sup>. A avaliação microbiológica de fitoterápicos realizada na cidade de Piracicaba pesquisou a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp. e clostrídios sulfitorredutores, sendo verificada a presença somente de *Escherichia coli*<sup>22</sup>. A presença desse micro-organismo nos três estudos denota sua relevância, por ser um patógeno amplamente pesquisado, e demonstra que os medicamentos estudados tiveram contaminação de origem fecal.

Em estudos realizados em outros países (na Nigéria, em 2007), a identificação das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus* foram comuns em amostras de fitoterápicos. Porém, o que divergiu dos resultados encontrados foi a presença de *Salmonella* spp.<sup>26</sup>. Na Arábia Saudita, em 2008, foram identificados *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella rhinoscleomati* e, em comum com os identificados no presente estudo, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, sendo que a presença deste último foi extremamente significativa, atingindo um percentual de 45% das amostras. Em estudo realizado no Irã, foi identificado somente *Salmonella* spp.<sup>27,28</sup>.

A pesquisa de fungos revelou a presença de duas espécies: *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus*, sendo que uma revisão da literatura indicou a ocorrência de aflatoxinas em fitoterápicos nos estudos realizados na Malásia e Tailândia<sup>29,30</sup>.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, em produtos farmacêuticos não estéreis e em matérias-primas de uso para sua fabricação, devem ser ausentes os seguintes micro-organismos: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*<sup>22</sup>. A 4ª edição da Farmacopeia Brasileira também determina que, considerando a via de administração do produto, é indesejável a presença de outros micro-organismos, sendo para via oral (sólidos e líquidos) *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp., *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Considerando que todos os medicamentos estudados destinavam-se à administração oral, foram também identificados *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp., *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus*. Porém, é necessário ressaltar que a nova edição da Farmacopeia Brasileira aboliu a exigência

de ausência de micro-organismos segundo a via de administração do medicamento<sup>20,21</sup>.

A contaminação de medicamentos é extremamente indesejável porque pode promover a deterioração do produto, visto que reside nestes uma versatilidade de caminhos bioquímicos possibilitando aos micro-organismos a síntese de enzimas degradativas. Dentre os micro-organismos identificados neste trabalho, *Bacillus* spp. têm capacidade de produzir alfa-amilases, que degradam açúcares; *Aspergillus* são fontes comuns de proteinases e peptidases, que degradam compostos como gelatinas; e a produção de lipase é comum entre os fungos<sup>18</sup>.

Deve-se considerar que a eficácia e a segurança do medicamento estão relacionadas com o controle de qualidade<sup>31</sup>. Além disso, o consumo de produtos contaminados pode ter um impacto negativo à saúde humana. A experiência tem mostrado que produtos contaminados podem não ter alterações perceptíveis, porém, podem ocasionar infecção em pacientes com sistema imunológico comprometido, idosos e crianças<sup>18</sup>. No caso dos micro-organismos identificados na atual pesquisa, essa questão deve ser considerada, pois a maioria dos micro-organismos é oportunista.

Os estudos que abordam o controle de qualidade de fitoterápicos sugere necessidade de uma regulação mais rígida e específica dessa espécie de produto, além da adoção de boas práticas no manejo agrícola, monitoramento das boas práticas na indústria e controle microbiológico rotineiro pelos órgãos de vigilância sanitária<sup>27,28,31,32</sup>.

## CONCLUSÃO

Foram pesquisadas trinta amostras de fitoterápicos, das quais 80% foram consideradas insatisfatórias em relação aos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira. Todas as espécies vegetais apresentaram contaminação. Foram identificadas 19 espécies diferentes de micro-organismos, sendo 17 espécies de bactérias e duas de fungos.

Quanto aos micro-organismos isolados neste estudo, maioria das bactérias e fungos identificados era patógenos oportunistas, podendo representar risco à saúde dos consumidores com sistema imunológico comprometido, idosos, crianças e gestantes. Foram identificados: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter planticola*, *Cedecea*

*davisae*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus*, sendo que alguns destes microrganismos deveriam estar ausentes, de acordo com critério de estabelecido na 4ª edição da Farmacopeia Brasileira, porém extinto na 5ª edição.

Em virtude do aumento do mercado consumidor desses produtos, são necessários mais estudos sobre esse tema, que abrange aspectos microbiológicos, químicos e toxicológicos. Além disso, a instituição de um programa de monitoramento microbiológico serviria de base para ações de vigilância sanitária, sendo uma ferramenta útil para a melhora da qualidade e garantia da segurança desses produtos.

## REFERÊNCIAS

1. Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Textocontexto-enfermagem*. 2006;15(1):115-21.
2. Kingston DGI. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod*. 2011;74:496-511.
3. Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, ShuqairNmsaq, Netto EM. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T & C Amazônia*. 2007;11:26-32.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 5 abr 2010. Seção 1, nº 63, p. 85.
5. Calixto JB, Siqueira JM. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gaz Med Bahia*. 2008;78 (Suplemento 1):98-106.
6. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím Nova*. 2002;2(1):45-61.
7. Calixto, JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol*. 2000;33(2):179-89.
8. DeSmet PAGM. Health risks of herbal remedies: an update. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76:1-17.
9. Ernst E, Pittler MH. Risks associated with herbal medicinal products. *Wiener Med Wochenschrift*. 2002;152:183-9.
10. Varanda EA. Atividade mutagênica de plantas. *Rev Ciênc Farmac Basic Aplic*. 2006;27(1):1-7.
11. Brasil. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 jun 2006. Seção 1, nº 119.
12. Ministério da Saúde. RENSUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. [acesso 2012 dez 3]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENSUS.pdf].

13. Zaroni M, Pontarolo R, Abrahão WSM, Fávero MLD, Correa Júnior C, Streme LDP. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. *Rev Bras Farmacognos*. 2004;14(1):29-39.
14. Fischer DCH. Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1992.
15. Bugno A, Buzzo AA, Nakamura CT, Pereira TC, Matos D, Pinto TJA. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41(4):491-7.
16. Melo JG, Nascimento VT, Amorim ELC, Andrade Lima CS, Albuquerque UP. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.) *Rev Bras Farmacognos*. 2004;14(2):111-20.
17. Brasil. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 set 1990; Seção 1:018055.
18. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos. 3. ed. São Paulo (SP): Ateneu; 2010.
19. Freitas A. Estrutura de mercado do seguimento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007.
20. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Brasília (DF): Anvisa; 2010.
21. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. Brasília (DF): Anvisa; 2002.
22. Paixão FG, Oliveira DP, Silva PB. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Hig Aliment*. 2004;18:55-7.
23. European Pharmacopeia. 6ª ed. Estrasburgo: Council of Europe, 2008.
24. British Pharmacopoeia 2011. Londres: The Stationery Office; 2011.
25. The United States Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, MD; 2010.
26. Okunlola A, Adewoyin BA, Odeku OA. Evaluation of the pharmaceutical and microbial qualities of some Herbal Medicinal Products in South Western Nigeria. *Trop J Pharma Res*. 2007;6(1):661-70.
27. Alwael SS. Microbial and heavy metals contamination of herbal medicines. *Res J Microbiol*. 2008;3(12):683-91.
28. Enayatifard R, Asgaritad H, Kezemi-Sanib. Microbial quality of some herbal solid dosage forms. *African J Biotechnol*. 2008;9:1701-5.
29. Ali N, Hashim NH, Saad B, Safan K, Nakajima M, Yoshizawa T. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food Chem Toxicol*. 2005;43:1763-72.
30. Tassaneeyakul W, Razzazi-Fazeli E, SupatraPJ. Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. *Mycopathol*. 2004;158:239-44.
31. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. 2010;81:462-71.
32. Kosolec I, Cvek J, Tomic S. Contamination of medicinal herbs and herbal products. *Arch Ind Hyg Toxicol*. 2009;60:485-501.



# Avaliação dos aspectos do controle da qualidade de produtos cosméticos comercializados no Brasil analisados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## Analysis on the quality control aspects of cosmetic products commercialized in Brazil performed by the National Institute of Quality Control in Health

RIALA6/1503

Priscila da Nobrega RITO<sup>1</sup>, Rosaura de Farias PRESGRAVE<sup>2</sup>, Eloisa Nunes ALVES<sup>2</sup>, Gisele HUF<sup>1</sup>, Maria Helena Simões VILLAS BÔAS<sup>3\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>3</sup>Setor de Saneantes, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4.365, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel.: 55-21-3865-5174, 55-21-3865-5103; fax: 55-21-2290-0915. E-mail: maria.villas@incqs.fiocruz.br

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup>Setor de Toxicologia, Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Recebido: 09.02.2012 – Aceito para publicação: 31.05.2012

### RESUMO

Os produtos cosméticos são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, que têm o objetivo principal de limpar, perfumar, alterar e/ou corrigir odores corporais e manter o corpo em bom estado. Por ter essas funções, esses produtos são utilizados diariamente por milhões de pessoas – e, por isso, é fundamental efetuar a vigilância da qualidade desses produtos. Neste trabalho, foi examinada a documentação de 133 produtos cosméticos que foram recebidos e analisados no Instituto Nacional de Controle da Qualidade (INCQS) no período de 2005 a 2009. Desvios referentes aos parâmetros físico-químico, microbiológico e toxicológico foram encontrados. O dado mais surpreendente foi referente à rotulagem desses produtos, visto que 94% dos produtos avaliados apresentaram o rótulo em desacordo com a legislação brasileira vigente.

**Palavras-chave.** cosméticos, controle de qualidade, vigilância sanitária, rotulagem.

### ABSTRACT

The cosmetic products are defined as preparations consisted of natural or synthetic substances, for external use in the diverse parts of the human body, for cleaning, perfuming, modifying and/or correcting the corporal odors, and to keep the body in good condition. Due to these attributes, the cosmetic products have been daily used by millions of people, therefore, it is crucial to monitor the quality of these products. This study examined the documentation of 133 cosmetic products which were sent and analyzed at the National Institute of Control of Quality (INCQS) during the period from 2005 to 2009. Non-complying data on the physical-chemical, microbiological and toxicological parameters were found. The most unexpected report was related to the products labels, as in 94% of evaluated products the label was in disagreement with the Brazilian legislation in force.

**Keywords.** cosmetics products, quality control, health surveillance, analysis of label.

## INTRODUÇÃO

Os produtos cosméticos são usados pelo homem desde épocas remotas. Inicialmente, as fontes de seus ingredientes eram essencialmente plantas, animais e minerais<sup>1</sup>. No entanto, o avanço da tecnologia resultou na inclusão de muitas substâncias químicas sintéticas na formulação desses produtos<sup>1</sup>. Atualmente, a variedade de produtos com diferentes finalidades de uso, principalmente produtos de higiene, é ampla e atinge um grupo populacional cada vez maior<sup>1</sup>. Em relação ao mercado, a Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresentou um faturamento Ex-Factory, líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4,9 bilhões em 1996 e de R\$ 24,9 bilhões em 2009<sup>2</sup>. Existem, no Brasil, 1.659 empresas atuando no mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, sendo que 14 empresas de grande porte, com faturamento líquido de impostos acima dos R\$ 100 milhões, representam 73% do faturamento total<sup>2</sup>. Em comparação ao mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, conforme dados mais recentes do Euromonitor Internacional de 2010, o Brasil ocupa a terceira posição, apresentando 10% de participação no mercado mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e do Japão<sup>3</sup>. O país é o primeiro no mercado em desodorante, produtos infantis e perfumaria; segundo no mercado em produtos masculinos e produtos para higiene oral, proteção solar, cabelos e banho; sendo considerado o terceiro mercado em produtos cosméticos em geral<sup>3</sup>.

Os produtos cosméticos são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano como pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, que têm o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los e/ou mantê-los em bom estado<sup>4,5</sup>. De acordo com o grau de risco que oferecem, os produtos cosméticos são classificados em Grau 1 (produtos de risco mínimo) e Grau 2 (aqueles com risco potencial). Outros tipos de classificação podem envolver a finalidade do uso do produto, áreas do corpo abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados quando da sua utilização<sup>6</sup>.

Esses produtos estão sujeitos ao regime de Vigilância Sanitária como disposto na Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976<sup>7</sup>, regulamentada pelos Decretos nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977<sup>8</sup> e nº 3.961, de 10 de

outubro de 2001<sup>9</sup>, além de serem regulamentados por outras legislações específicas. Assim, no ato do registro desses produtos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), conforme a legislação brasileira vigente e harmonizada no Mercado Comum do Sul (Mercosul), é exigida a apresentação dos dados dos ensaios de Controle de Qualidade. Esses ensaios têm por objetivo avaliar as características físicas, químicas e microbiológicas das matérias-primas, embalagens, produtos em processo de fabricação e produtos acabados. A verificação da conformidade das especificações deve ser vista como um requisito necessário para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto, e não somente como uma exigência regulatória<sup>10</sup>. Existem diferentes tipos de modalidades de análises de controle de qualidade, sendo elas: a análise prévia, efetuada antes da comercialização dos produtos; a análise de controle, realizada imediatamente após a entrada do produto no mercado, destinada a comprovar a conformidade do produto em relação à documentação apresentada em seu registro; e a análise fiscal, realizada em caráter de rotina, para apuração de infração ou verificação de ocorrência de desvio quanto à qualidade, segurança e eficácia dos produtos ou matérias-primas<sup>8</sup>. No Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) são ainda realizadas as análises de orientação e especial, não previstas na legislação, mas realizadas respectivamente, com a finalidade de fornecer subsídio às ações pertinentes aos programas de verificação da qualidade dos produtos, e aquela efetuada em amostras visando atender a programas de pesquisa e desenvolvimento de metodologias analíticas, estabelecimento de materiais de referência ou outras atividades relacionadas à missão e funções do Instituto<sup>11</sup>.

Vale ressaltar que os produtos cosméticos têm como características, além da condição de uso diário, o uso repetido de algumas categorias como, por exemplo, os cremes dentais e sabonetes. Aliado a isto está o fato de que esses produtos podem ser usados extensivamente durante um amplo período de nossa vida, por isso é extremamente necessário garantir a segurança e eficácia dos mesmos, por meio do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes, conforme vários autores relatam na literatura<sup>12-14</sup>. Dados de 2009, do Sistema Nacional de Informação Tóxico Farmacológicas (Sinitox), os mais recentes publicados nesse sistema, indicam a ocorrência de 1.230 casos registrados de intoxicação humana por cosméticos no Brasil nesse ano<sup>15</sup>.

Embora a compatibilidade de produtos cosméticos com a pele seja avaliada cuidadosamente antes da

comercialização desses produtos, alguns ingredientes podem inevitavelmente causar reações na pele, como irritações e até alergias. Vários estudos demonstram que mais de 10% dos pacientes submetidos ao *patch test* são alérgicos a produtos cosméticos ou a um de seus ingredientes<sup>16</sup>. Conservantes, fragrâncias e pigmentos capilares são causas frequentes de dermatites de contato<sup>17-19</sup>.

Outro componente desencadeador de dermatites são os filtros solares. A incidência de dermatites de contato fotoalérgicas devido ao uso de filtros solares não é muito clara, mas pode variar de 1 a 40% segundo a história de fotossensibilidade do paciente<sup>20</sup>. As substâncias químicas fotoprotetoras e conservantes são os mais frequentes alergênicos causadores de dermatite de contato fotoalérgica<sup>20</sup>.

Contudo, a forma mais comum de intolerância a cosméticos é caracterizada por irritação, sensação de queimação, leve coceira com pequenas evidências cutâneas locais, tipo eritema, na zona de aplicação do produto<sup>21</sup>.

O uso inadequado do produto cosmético também é causa frequente de reação adversa como, por exemplo, utilizar o produto em outra região do que a indicada, fazer uso do produto por um tempo maior que o indicado e não seguir as instruções do fabricante<sup>22</sup>.

Considerando o destaque que os produtos cosméticos vêm conquistando no mercado, aliado à importância da necessidade de garantir a segurança desses produtos, o objetivo deste trabalho é descrever o perfil da qualidade dos produtos cosméticos enviados ao INCQS no período de 2005 a 2009 quanto aos resultados obtidos em ensaios toxicológicos, microbiológicos, físico-químicos e de rotulagem em relação à legislação sanitária vigente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Levantamento de dados das análises de controle da qualidade de produtos cosméticos realizadas no INCQS

Foi realizada uma revisão retrospectiva dos processos arquivados no INCQS referentes às análises de produtos cosméticos realizadas no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009, advindas de solicitações de análise fiscal, de análise de orientação e de análise especial encaminhadas principalmente pelas Vigilâncias Sanitárias Municipais, Estaduais, pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), pela Anvisa e pelo Poder Judiciário. Os dados foram extraídos da ficha de cadastro e do boletim de análise de cada amostra, sendo estudadas as seguintes variáveis: categoria do produto, localização do

fabricante, estado onde foi realizada a coleta, tipo de análise, solicitante, motivo de apreensão, resultados parcial e final das análises realizadas. As amostras foram classificadas de acordo com o risco, em Produtos de Grau de Risco 1 ou Grau de Risco 2, conforme a resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005<sup>6</sup>. Para as análises laboratoriais, realizadas no período escolhido, as legislações sanitárias utilizadas foram: o Decreto Lei nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977<sup>8</sup>, que regulamenta a lei que submete os produtos cosméticos ao sistema de vigilância sanitária; a Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999<sup>23</sup>, que estabelece parâmetros para controle microbiológico de produtos cosméticos; a Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005<sup>6</sup>, que estabelece a definição e classificação de produtos cosméticos e de normas de rotulagem para esses produtos; a Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001<sup>24</sup>, que publica a lista de conservantes permitidos; a Resolução RDC nº 215, de 25 de julho de 2005<sup>25</sup>, que aprova o regulamento técnico “Listas de substâncias que os produtos cosméticos não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas”; a Resolução RDC nº 343, de 13 de setembro de 2005<sup>26</sup>, que institui novo procedimento totalmente eletrônico para a notificação de produtos cosméticos e perfumes de Grau 1; e a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2006<sup>27</sup>, que aprova o regulamento técnico e lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos cosméticos. Os dados foram tabulados e analisados utilizando-se o programa Epi Info 6.0.

## RESULTADOS

### Produtos analisados

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009, foram enviadas ao INCQS 156 amostras de produtos cosméticos, sendo que 23 não foram analisadas por motivo de cancelamento. Os principais motivos de cancelamento das amostras foram: falta de pagamento das análises de controle (30,4%); falta de parâmetros na legislação para fazer a análise (26,1%); os produtos não terem sido apreendidos conforme a lei nº 6.437/77 (21,7%); produtos com data de vencimento expirando quando enviados para a análise (17,4%); e produto que originou uma reação sistêmica (4,4%), onde não pode ser observada correlação direta dos sintomas com possíveis causas.

Entre as 133 amostras analisadas, 23 eram comercializadas sob a forma de kit (contendo 2 ou mais produtos e suas respectivas embalagens). As principais categorias analisadas foram: tintura capilar permanente,

**Tabela 1.** Diferentes categorias de produtos cosméticos analisados no INCQS no período de 2005 a 2009 de acordo com a classificação do Grau de Risco

	Categorias	N (%)	
Risco I	Condicionadores	14 (10,52%)	
	Sabonete facial e ou corporal	11 (8,30%)	
	Xampu	11 (8,30%)	
	Restaurador capilar	5 (3,76%)	
	Brilho labial	2 (1,50%)	
	Creme ou gel para assentar os cabelos	2 (1,50%)	
	Depilatório/epilatório mecânico	2 (1,50%)	
	Creme rinse	1 (0,75%)	
	Desodorante axilar	1 (0,75%)	
	Esmalte/verniz para as unhas	1 (0,75%)	
	Fralda	1 (0,75%)	
	Máscara Facial argilosa	1 (0,75%)	
	Máscara capilar	1 (0,75%)	
	Óleo para cabelo	1 (0,75%)	
	Risco II	Tintura capilar permanente	20 (15,04%)
		Alisante para cabelos	9 (6,77%)
		Dentífrico anticárie	6 (4,51%)
Protetor solar		6 (4,51%)	
Sabonete antisséptico		4 (3,00%)	
Desodorante antitranspirante/antiperspirante axilar		4 (3,00%)	
Xampu anticasca/antiqueda e/ou outros benefícios específicos		4 (3,00%)	
Alisante que tingem os cabelos		3 (2,26%)	
Bloqueador Solar		3 (2,26%)	
Clareador da pele		3 (2,26%)	
Xampu colorante/tonalizante		3 (2,26%)	
Bronzeador solar		2 (1,50%)	
Creme para o corpo com finalidade exclusiva de hidratação- grau 2		2 (1,50%)	
Creme para o corpo com fotoprotetor ou com outras finalidades		2 (1,50%)	
Bronzeador simulatório		1 (0,75%)	
Creme para celulites/estrias		1 (0,75%)	
Creme para rosto com finalidade anti-rugas		1 (0,75%)	
Descolorante para cabelos		1 (0,75%)	
Óleo para massagem com outras finalidades além de hidratação e refrescância		1 (0,75%)	
Tintura capilar temporária		1 (0,75%)	
Tintura progressiva	1 (0,75%)		
Xampu infantil	1 (0,75%)		
TOTAL	133 (100%)		

condicionador, sabonete facial e/ou corporal e xampu (Tabela 1).

### Relação entre os tipos de análises e distribuição entre os Graus de Risco

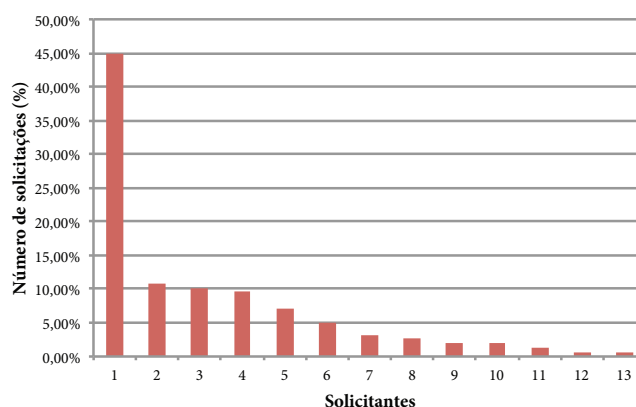
Das 133 amostras analisadas, 54 amostras foram classificadas como pertencentes ao Grau de Risco 1, das quais 35 (64,8%) foram submetidas à análise na modalidade fiscal, 14 (25,9%) na modalidade orientação e 5 (9,3%) na modalidade especial. Já entre os 79 produtos pertencentes ao de Grau de Risco 2, 45 (57%) foram submetidos à análise fiscal e 34 (43%) à de orientação.

### Motivos de apreensão

Os motivos de apreensão das amostras recebidas no INCQS foram: 86 (47,8%) por suspeita de reações adversas; 59 (32,8%) por suspeita de desvio de qualidade; 10 (5,5%) por demanda judicial; e 25 (13,9%) por outros motivos. Vinte e quatro amostras apresentaram dois motivos de apreensão cada, totalizando 180 motivos. É importante ressaltar que, entre as amostras apreendidas por demanda judicial: 5 (2,7%) foram por denúncia de lesão corporal culposa; 2 (1,1%) por denúncia do ministério público; 1 (0,6%) por causa judicial (indenização por danos morais); 1 (0,6%) por exame pericial por acidente doméstico; e 1 (0,6%) por inquérito policial.

### Solicitantes das análises

No período estudado, foram registradas demandas oriundas de 13 diferentes instâncias públicas, sendo predominantes aquelas demandas advindas dos LACENS (70 [44,9%]). Na Figura 1, podemos observar o número de solicitações e as principais instâncias demandantes.



**Figura 1.** Distribuição dos solicitantes das análises realizadas no INCQS no período de 2005 a 2009

Sendo: 1. LACENs; 2. Secretaria Estadual de Saúde; 3. Secretaria Municipal de Saúde; 4. Instituto Nacional de Metrologia (Inmetro); 5. Prefeituras Municipais; 6. Anvisa; 7. INCQS-Grupo Técnico/Cosmético; 8. Fundação Ezequiel Dias (FUNED); 9. Secretaria de Atenção à Saúde (SAUB/DAB/SAS/MS); 10. Poder Judiciário; 11. Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz; 12. Hospital Geral de Bonsucesso; 13. Requerente não consta.

### Fabricantes dos produtos

Dentre os produtos apreendidos, 149 (95,5%) eram fabricados por indústria nacional e 7 (4,5%) importados (Itália). Os fabricantes nacionais estavam localizados nos seguintes estados: 52 (34,9%) no Rio de Janeiro; 44 (29,5%) em São Paulo; 13 (8,7%) no Paraná; 8 (5,4%) na Bahia; 7 (4,7%) em Goiás; 7 (4,7%) em Minas Gerais; 4 (2,7%) no Rio Grande do Sul; 1 (0,7%) em Pernambuco; 1 (0,7%) em Santa Catarina; e 12 (8%) em local não declarado.

### Resultado das análises laboratoriais

Nenhum produto foi analisado nas quatro modalidades: rotulagem, análise físico-química, análise toxicológica e análise microbiológica. Isso aconteceu porque, dependendo do motivo pelo qual as amostras

foram encaminhadas ao INCQS para serem analisadas, alguns tipos de análises foram suprimidos.

### Rotulagem

A análise de rótulo foi realizada em 120 amostras, sendo obtidos apenas 7 (6%) resultados satisfatórios. Os desvios detectados nos rótulos das amostras insatisfatórias foram relativos: ao Registro ou à Notificação, à fórmula (composição), ao modo de uso, ao fabricante/distribuidor, à embalagem dos produtos, à data de fabricação, relativo à data de validade, ao código de barras, ao nome do produto, à declaração do Responsável Técnico e seus dados, à falta do número de lote, ao texto de advertência não estar igual ao que foi declarado à Anvisa e à categoria a que pertence o produto não estar no rótulo. Os produtos classificados como Grau de Risco 2 (com pelo menos 3 produtos/categoria) com maior frequência de reprovação no teste de rotulagem estão descritos na Tabela 2, e pode ser observado que os principais desvios ocorreram em relação a falta da data de fabricação e a não adequação das frases de advertência. Cabe ressaltar que todos os produtos analisados no requisito rotulagem, e que foram reprovados,

**Tabela 2.** Frequência das principais categorias de produtos cosméticos Grau de Risco 2 insatisfatórios no ensaio de rotulagem analisados no INCQS no período de 2005 a 2009

Categoria de Produto (Nº total)	Registro	Fórmula	Fabricante/Distribuidor	Embalagem	Data de Fabricação	Nome do Produto	RT e seus dados	Nº de Lote	Frases de Advertência	Nº de produtos reprovados (%)
Tintura capilar permanente (20)	1	4	1	0	13	0	2	1	15	100
Alisante para cabelos (9)	6	0	1	2	2	1	1	0	2	88,9
Sabonete facial antisséptico(4)	1	1	2	0	0	2	2	2	0	100
Dentífrico anticárie (6)	0	0	3	1	4	0	0	0	2	100
Protetor solar (6)	2	0	1	1	0	0	1	0	0	66,7
Desodorante antitranspirante / antiperspirante axilar (4)	0	2	0	0	4	0	0	0	0	100
Xampu anticaspa / antiqueda e/ou outros benefícios específicos (4)	2	2	0	0	1	0	0	0	0	100
Xampu colorante / tonalizante (3)	1	0	0	0	2	0	0	0	2	100
Bloqueador solar (3)	1	0	0	0	1	0	0	1	1	100
Alisante que tingem os cabelos (3)	2	0	0	1	0	0	0	0	1	100
Clareador da pele (3)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<b>TOTAL</b>	<b>19</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>23</b>	

RT = Responsável Técnico.

pertenciam às principais categorias de cosméticos, como tintura capilar permanente, sabonete facial antisséptico, dentífrico anticárie, desodorante antitranspirante, xampu anticaspa/antiqueda, xampu colorante/tonalizante, bloqueador solar, alisante que tingem os cabelos e clareador da pele. Por outro lado, ao analisar os produtos de Grau de Risco 1, os principais desvios em relação a rotulagem verificados foram a falta da data de fabricação (em 16 produtos) e problemas inerentes à notificação (11 produtos). O único produto isento de registro, que teve seu rótulo analisado, pertencia à categoria fralda, e o desvio apresentado foi não apresentar data de fabricação. Cabe ressaltar que 50 produtos analisados apresentaram mais de uma categoria de desvio de rótulo, totalizando 199 desvios.

#### Análises físico-químicas

Foram realizadas em 70 amostras, sendo obtido resultado satisfatório em 50 (71,4%) amostras e insatisfatório em 20 (28,6%) amostras. Os ensaios realizados foram os seguintes: pH, teor do princípio ativo, presença de substância proibida, aspecto físico-químico e presença de formol. A frequência de reprovação nos ensaios físico-químicos está descrita por produto na Tabela 3. Cabe ressaltar que, no caso de produtos apresentados na forma de kit, quando pelo menos um dos produtos apresentava desvio em determinado parâmetro físico-químico, o resultado para o kit foi considerado insatisfatório. Em relação ao pH, embora os produtos principais do kit não tenham apresentado desvio (exemplo no kit de coloração o produto principal é o colorante), 3 kits foram considerados insatisfatórios. São eles: amostra 3256/2005 – tintura capilar permanente (desvio da qualidade apresentado pela água oxigenada); amostra 3024/2006 – alisante para os cabelos

(desvio da qualidade apresentado pelo creme ativador do relaxamento, que também é o próprio relaxante capilar); e amostra 2155/2007 – alisante para os cabelos (desvio da qualidade presente no xampu indicador).

Nas 15 amostras onde o valor de pH foi insatisfatório, 12 (80%) apresentaram valor mais alto que o estabelecido e 3 (20%), valor mais baixo.

Dos oito produtos analisados em relação ao teor de princípio ativo, todos apresentaram valor menor do que o declarado. Embora o alisante capilar, produto principal do kit da amostra 3024/2006, não tenha apresentado desvio, outros dois componentes do kit apresentaram desvios: o creme ativador, que também é um alisante capilar, e o xampu.

Nenhum produto foi insatisfatório quanto à análise do aspecto físico-químico e presença de formol. Porém, é importante ressaltar que, em uma amostra de tintura progressiva, foi encontrada a presença de uma substância proibida pela atual legislação: o chumbo.

#### Análises toxicológicas

Foram realizadas em 32 amostras, tendo sido satisfatórias em 18 (56%) e insatisfatórias em 14 (44%). Os ensaios realizados foram os seguintes: Irritação Cutânea, Irritação da Mucosa Oral e Irritação Ocular. A frequência de reprovação nos ensaios toxicológicos está descrita por produto na Tabela 4. É importante destacar que nenhum dos produtos testados no Ensaio de Irritação Ocular teve resultado insatisfatório.

#### Análises microbiológicas

Foram realizadas em 41 amostras, sendo obtido resultado satisfatório em 36 (87,8%) e insatisfatório

**Tabela 3.** Frequência de produtos cosméticos insatisfatórios (N = 20) nos ensaios físico-químicos realizados no INCQS no período de 2005 a 2009

		Análises Físico-Químicas			
		N (%)	pH	Teor Princípio Ativo	Presença substância proibida
<b>Risco I</b>	Xampu	5(7,15%)	3(4,3%)	2(2,8%)	0
	Condicionador	1(1,4%)	2(2,8%)	0	0
	Restaurador capilar	1(1,4%)	1(1,4%)	0	0
<b>Risco II</b>	Tintura capilar permanente	5(7,15%)	5(7,15%)	1(1,4%)	0
	Alisante capilar	3(4,3%)	3(4,3%)	2(2,8%)	0
	Alisante que tingem os cabelos	1(1,4%)	1(1,4%)	0	0
	Bronzeador solar	1(1,4%)	0	1(1,4%)	0
	Tintura progressiva	1(1,4%)	0	0	1(1,4%)
	Xampu anticaspa, antiqueda e outros benefícios	1(1,4%)	0	1(1,4%)	0
	Xampu colorante/tonalizante	1(1,4%)	0	1(1,4%)	0
	<b>TOTAL</b>	<b>20(28,6%)</b>	<b>15(21,4%)</b>	<b>8(11,4%)</b>	<b>1(1,4%)</b>

**Tabela 4.** Frequência de produtos cosméticos insatisfatórios (N = 14) nos ensaios toxicológicos realizados no INCQS no período de 2005 a 2009

		Análises toxicológicas		
		N(%)	Irritação cutânea (analisado/reprovado)	Irritação da mucosa oral (analisado/reprovado)
<b>Risco I</b>	Sabonete	2(6,3)	2 / 2	0
	Dentifrício anticárie	6(18,8)	0	6 / 6
	Tintura capilar permanente	3(9,4)	3 / 3	0
<b>Risco II</b>	Protetor solar	1(3,1)	2 / 1	0
	Sabonete antisséptico	1(3,1)	1 / 1	0
	Xampu anticaspa e/ou outros benefícios	1(3,1)	1 / 1	0
<b>TOTAL</b>		14(44%)	8(25%)	6 (19%)

em apenas cinco (12,2%). Os ensaios realizados foram: contagem de Mesófilos Totais e a pesquisa da presença de alguns micro-organismos (Coliformes Fecais, Coliformes Totais, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). Cinco produtos foram reprovados, pois apresentaram concentração de Mesófilos Totais maior que  $5 \times 10^3$  UFC/g ou mL, em desacordo com o que estabelece a Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999<sup>23</sup>. Dentre esses produtos, três eram sabonetes de Grau de Risco 1, e dois pertenciam à categoria de sabonete facial e/ou corporal antisséptico, sendo de Grau de Risco 2.

### Resultado final

Quando todos os resultados são analisados em conjunto, envolvendo o tipo de ensaio realizado, sendo ele microbiológico, físico-químico, toxicológico e de rotulagem, em relação à categoria de produto onde ele foi aplicado, tem-se como resultado final que, das 133 amostras analisadas, 123 (92,5%) foram consideradas insatisfatórias e apenas 10 (7,5%) foram satisfatórias.

## DISCUSSÃO

Há diversos relatos na literatura científica de substâncias presentes em cosméticos que apresentam toxicidade. Outras substâncias, por sua vez, apresentam limites aceitáveis, como corantes e conservantes, devendo-se respeitar a legislação vigente quanto à concentração em que devem ser incorporados às formulações<sup>12,24,28</sup>. As potenciais reações adversas aos cosméticos compreendem um largo espectro de reações cutâneas, incluindo irritações, reações de hipersensibilidade tardia, urticária de contato, fotossensibilização (fototóxica ou fotoalérgica), doenças pigmentares, danos à unha e a cabelos, erupções acneiformes, foliculites e piora de dermatoses pré-existentes<sup>29</sup>. Por isso se faz necessário o monitoramento dos produtos cosméticos, tanto em

relação aos limites das substâncias, quanto à presença de substâncias proibidas nas formulações.

A maioria dos produtos cosméticos que foi analisada neste trabalho foi oriunda de análise fiscal (60,2%), ou seja, análise devido a uma denúncia, que pode ter sido gerada em função de um evento adverso ou pela ausência de qualidade ou de eficácia do produto.

Ao se analisar o resultado final, vê-se que, para a maioria dos produtos (92,5%), foram obtidos resultados insatisfatórios, sendo que, nos 10 produtos com resultados satisfatórios, somente 4 eram de Grau 2. Ou seja, dos 72 produtos de Grau 2 que foram analisados, 68 (94,4%) apresentaram resultados insatisfatórios. Esse dado é bastante relevante quando se pensa no risco potencial que os produtos mencionados podem trazer à população.

Os produtos cosméticos podem ser contaminados de duas maneiras: durante a produção ou durante o uso pelo consumidor. A contaminação pode causar indesejáveis mudanças na composição, no odor e na coloração dos produtos. Além disso, a contaminação microbiológica pode estragar o produto e o micro-organismo pode ser patogênico, representando potenciais perigos para o usuário. Infecções causadas por produtos cosméticos contaminados são relativamente raras atualmente, mas existem casos relatados em pacientes hospitalizados, como o caso de cinco pacientes internados que, ao usar um hidratante corporal à base de leite, foram contaminados com cepas de *Burkholderia cepacia*<sup>30</sup>. Neste trabalho, com relação aos dados microbiológicos, tem-se que 5 (12,2%) produtos, dos que foram submetidos a esse tipo de análise, apresentaram resultado insatisfatório, sendo 2 produtos de Grau 2. Nesses 5 produtos, foi detectada a presença de mesófilos totais acima do que é permitido pela legislação vigente, que é  $5 \times 10^3$  UFC/g ou mL.

Na análise físico-química, 20 produtos apresentaram resultado insatisfatório, sendo 13 produtos

de Grau 2. O principal desvio encontrado foi em relação à faixa do pH declarado. A maioria apresentou valor maior de pH do que o informado, podendo vir a acarretar problemas na integridade da pele<sup>31</sup>. Além disso, em uma amostra de tintura progressiva, foi detectada a presença de chumbo. Há relatos que o chumbo pode gerar desde efeitos clínicos até efeitos bioquímicos. Estes últimos envolvem vários sistemas de órgãos e atividades bioquímicas. Nas crianças, os efeitos críticos atingem o sistema nervoso, enquanto que, nos adultos com exposição ocupacional excessiva ou mesmo accidental, os cuidados são com a neuropatia periférica e a nefropatia crônica. Também os sistemas gastrintestinal e reprodutivo são alvo da intoxicação pelo chumbo<sup>32</sup>.

Ao se analisar o perfil toxicológico, 14 (44%) amostras das que foram submetidas a este teste apresentaram resultado insatisfatório, sendo 12 amostras de Grau 2. O principal efeito toxicológico encontrado foi a irritação cutânea.

O pior resultado observado foi, no entanto, em relação à rotulagem. Dos produtos que foram analisados, 94% foram considerados insatisfatórios. Os principais desvios observados foram relativos à data de fabricação, à notificação ou ao registro de produto, e à falta da categoria do produto no rótulo. No rótulo, devem ser encontradas as finalidades ou instruções de uso, as recomendações para que se leia o rótulo antes de utilizar o produto a fim de evitar seu uso indevido. Infelizmente, por subestimarem o risco dos cosméticos, a rotulagem desses produtos é, na maioria das vezes, incompleta e precária, embora exista legislação específica, como a RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, que estabelece os requisitos para a rotulagem de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes<sup>6</sup>.

## CONCLUSÃO

Este estudo conclui que a maior parte dos produtos (94%) que foi analisada no INCQS no período de 2005 a 2009 apresentou resultado insatisfatório, e o requisito que mais contribuiu para esse resultado foi a não adequação dos dizeres de rotulagem. Ocorreu também reprovação das amostras nas análises microbiológica, físico-química e toxicológicas. Das amostras submetidas à análise microbiológica, 12,2% foram reprovadas por apresentarem a concentração de mesófilos totais acima do estabelecido pela legislação vigente. Em relação à análise físico-química, 28,6% das amostras analisadas foram reprovadas, sendo a principal causa da reprovação a não adequação do pH das amostras. Já em relação à análise toxicológica, 44% das

amostras submetidas a esta análise foram consideradas insatisfatórias, sendo que 25% foram reprovadas no teste de irritação cutânea e 19% no teste de irritação da mucosa oral. Os dados obtidos sugerem negligência aos padrões de qualidade dos produtos cosméticos comercializados no Brasil no que concerne o preconizado pela legislação vigente, levando a um risco sanitário relevante quando constatamos na literatura a frequência com que esses produtos são usados pela população.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos a todos os Laboratórios do INCQS pelas análises físico-químicas, microbiológicas, toxicológicas e de rotulagem realizadas nos produtos cosméticos incluídos neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Leonardi GR. *Cosmetologia aplicada*. São Paulo (SP): Medfarma; 2004.
2. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC. *Dados do mercado brasileiro, 2009. Dados/cosméticos e produtos de higiene*. [acesso 2011 jan 18]. Disponível em: [<http://www.abihpec.org.br/anuario-abihpec-20092010/>].
3. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC. *Cadernos de tendências 2011. Principais movimentações globais/dados 2011*. [acesso 2011 nov 11]. Disponível em: [<http://www.abihpec.org.br/category/publicacoes/caderno-de-tendencias/>].
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000. Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e outros com abrangência neste contexto. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 31 de ago. 2000. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/79\\_2000.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/79_2000.pdf)].
5. Chorilli M, Scarpa MV, Leonardi GR, Franco YOL. *Toxicologia dos Cosméticos*. *Lat Am J Pharm*. 2007;26(1):1114-54.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 18 de jul. 2005. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [[http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap\\_suvisa/arquivos/gerados/resol\\_rdc\\_211\\_julho\\_2005.pdf](http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/resol_rdc_211_julho_2005.pdf)].
7. Brasil. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. *Diário*



- Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 12.647, 24 set 1976.
8. Brasil. Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 5 jan 1977. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/decreto\_79094\_77.pdf].
  9. Brasil. Decreto nº 3.961, de 10 de outubro de 2001. Altera o Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 11 out 1977. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/3961\_01.htm].
  10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª ed., revista. Brasília (DF): Anvisa; 2008.
  11. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Relatório de atividades do INCQS. 2004.
  12. Chorilli M, Tamascia P, Rossim C, Salgado HRN. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. *J Basic Appl Pharm Sci*. 2009;30(1):27-31.
  13. Docimo R, Montesani L, Maturo P, Costacurta M, Bartolino M, DeVizio W, et al. Comparing the efficacy in reducing dentin hypersensitivity of a new toothpaste containing 8% arginine, calcium carbonate, and 1450 ppm fluoride to a commercial sensitive toothpaste containing 2% potassium ion: an eight-week clinical study in Rome, Italy. *J Clin Dent*. 2009;20(1):17-22.
  14. De Groot AC, Flyvholm MA, Lensen G, Menné T, Coenraads PJ. Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Contact allergy to formaldehyde and inventory of formaldehyde-releasers. *Contact Dermatitis* 2009;61(2):63-85.
  15. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox). Uma análise/dados do hospital Vital Brasil [acesso 2012 maio 10]. Disponível em: [http://www.fiocruz.br/sinitox/sinitox2000.htm].
  16. Orton DI, Wilkinson JD. Cosmetic allergy: incidence, diagnosis, and management. *Am J Clin Dermatol*. 2004;5:327-37.
  17. Sosted H, Agner T, Andersen KE, Menn T. 55 cases of allergic reactions to hair dye: a descriptive, consumer complaint-based study. *Contact Dermatitis*. 2002;47:299-303.
  18. Kiec-Swierczynska M, Krecisz B, Swierczynska-Machura D. Allergy to cosmetics. II. Preservatives. *Med Pr*. 2004;55(3):289-92.
  19. Kiec-Swierczynska M, Krecisz B, Swierczynska-Machura D. Allergy to cosmetics. I. Fragrances. *Med Pr*. 2004;55:203-6.
  20. Wong T, Orton D. Sunscreen allergy and its investigation. *Clinics Dermatol*. 2011;29(3):306-10.
  21. Blondeel A. Intolerance reactions to cosmetics. *J Pharm Belg*. 1993;48(4):308-12.
  22. Sautebin L. Understanding the adverse effects of cosmetics: A pilot project in Cosmetovigilance. *Drug Safety* 2008;31(5):433-6.
  23. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/481\_99.htm].
  24. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 162 de 11 de setembro de 2001. Aprova a lista de conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosmético e perfumes que consta no anexo desta resolução. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 02 out 2001. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/162\_01rdc.htm].
  25. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 215, de 25 de julho de 2005. Aprova o regulamento técnico listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/215\_05rdc.pdf].
  26. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 343, de 13 de dezembro de 2005. Institui novo procedimento totalmente eletrônico para a Notificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes de Grau 1. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap\_suvisa/arquivos/gerados/resol\_rdc\_343\_dez\_2005.pdf].
  27. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 48, de 16 de março de 2006. Aprova o regulamento técnico listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/print.php?conteudo=682].
  28. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 503, de 12 de março de 2009. Aprova a lista de corantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosmético e perfumes que consta no anexo desta resolução. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 mar 2009. [acesso 2011 jan 29]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PT\_GM\_503\_2009.pdf].
  29. Castanedo-Tardan MP, Zug KA. Patterns of cosmetics contact allergy. *Dermatol Clin*. 2009;27(3):265-80.
  30. Alvarez-Lerma F, Maull E, Terradas R, Segura C, Planells I, Coll P, et al. Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: Outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care*. 2008;12(1):1-6.
  31. Kim E, Kim S, Nam GW, Lee H, Moon S, Chang I. The alkaline pH-adapted skin barrier is disrupted severely by SLS-induced irritation. *Int J Cosmet Sci*. 2009;31(4):263-9.
  32. Moreira FR, Moreira JC. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Rev Pan Salud Publ*. 2004;15(2):119-29.

# Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não fracionadas pelas metodologias de inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO) e de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

## Comparative study on the biological activity of non-fractionated heparin by using sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA) and activated partial thromboplastin time (APTT) methodologies

RIALA6/1504

Dalvim Pereira dos ANJOS<sup>1\*</sup>, André Vicente Plastino SILVA<sup>1</sup>, Sergio Alves da SILVA<sup>2</sup>, Wlamir Corrêa de MOURA<sup>3</sup>, Antonio Eugenio Castro Cardoso de ALMEIDA<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Fisiopatologia, Setor de Patologia Clínica, Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Avenida Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel.: (21) 3865-5140. E-mail: dalvim.pereira@incqs.fiocruz.br

<sup>2</sup>Diretoria de Gestão da Qualidade, Coordenação do Programa da Qualidade, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ

<sup>3</sup>Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Setor de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Vacina Hib, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz

Recebido: 07.11.2011 – Aceito para publicação: 30.09.2012

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo comparativo entre os métodos ICPO e TTPA, para avaliar a eficácia da implantação do TTPA como método para a avaliação da segurança e eficácia de heparinas não fracionadas em produtos farmacêuticos. Foram avaliados, comparativamente, cinco lotes de diferentes fabricantes de heparinas não fracionadas (polissacarídeo sulfatado usado como droga anticoagulante), de origem suína ou bovina, testadas com base no 5º Padrão Internacional de Heparina. Esses produtos foram provenientes de coletas efetuadas pelas autoridades sanitárias para análise no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). As amostras foram analisadas quanto à pureza e potência anticoagulante, por meio de duas metodologias: inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Houve boa concordância entre as duas metodologias, sendo que a técnica TTPA apresentou ser mais simples, rápida e objetiva, quando da utilização do coagulômetro para a medição do tempo de formação de coágulos, em detrimento da leitura subjetiva dos graus de coagulação no ensaio de ICPO. A implantação e a execução do TTPA em paralelo à utilização do ICPO garantirão o aumento de sensibilidade técnica na avaliação da segurança e eficácia de heparinas não fracionadas.

**Palavras-chave.** heparinas não fracionadas, controle da qualidade, ICPO, TTPA, vigilância sanitária.

### ABSTRACT

The aim of this study was to compare the methods of SPCIA and APTT to evaluate the effectiveness of the implementation of APTT as a method for assessing the safety and efficacy of unfractionated heparins in pharmaceuticals. Five lots of non-fractionated heparins (a sulfated polysaccharide used as anticoagulant) from porcine or bovine origin, and from different producers were comparatively evaluated. They were tested based on the 5th International Standard for Heparin, and they were collected by the Brazilian sanitary authorities for evaluating their purity and anticoagulant potency at the National Institute for Quality Control in Health (INCQS). Two methodologies were employed: sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA) and activated partial thromboplastin time technique (APTT). An excellent correlation between the both methodologies was found, and it showed that technique is easier, faster and objective due to the use of a coagulometer for measuring the clot-forming time, instead of SPCIA assay which uses the subjective visual determination of the coagulation degree. The implementation and execution of APTT technique and the concomitant use of SPCIA assay will improve the technique sensitivity for assessing the non-fractionated heparins safety and efficacy.

**Keywords.** non-fractionated heparins, quality control, SPCIA, APTT, sanitary surveillance.

## INTRODUÇÃO

A heparina, substância natural encontrada abundantemente nas vísceras de suínos e bovinos, é utilizada desde a década de 1930 na terapia anticoagulante, sendo apontada como um dos principais avanços terapêuticos que almejam a redução da mortalidade e incapacidade física, pois sua utilização visa minimizar os efeitos adversos decorrentes das doenças cerebrovasculares (hemorragia, lesões cutâneas e trombocitopenia) e, conseqüentemente, reduzir sua morbi-mortalidade<sup>1</sup>.

O resultado final de suas ações bioquímicas é a inibição da formação e síntese dos fatores ativados da coagulação que exercem funções críticas na formação do coágulo sanguíneo, já que a heparina atua tanto na trombina livre como na trombina ligada à fibrina, ativando a antitrombina III e, conseqüentemente, inibindo a coagulação<sup>2,3</sup>.

Além disso, a meia vida curta e dependente da dose, bem como a disponibilidade de um antídoto específico (o sulfato de protamina) lhe confere propriedades adicionais de grande relevância. Essas características a tornam o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina<sup>4</sup>.

É encontrada em duas apresentações clínicas: as Heparinas Não Fracionadas (HNF), com massas moleculares entre 4.000 e 6.000 Daltons, e as Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM), com massas moleculares entre 4.000 e 6.000 Daltons<sup>5,6</sup>.

Recentemente, sua demanda por avaliações de natureza fiscal aumentou devido à contaminação em seu processo de produção pela matéria-prima chinesa, sulfato de condroitina. Este fármaco não possui atividade anticoagulante, mas, quando quimicamente modificado por meio de supersulfatação, adquire essa característica, transformando-se em um mimético da heparina, não sendo detectável por metodologia analítica convencional. Esse fato promoveu um aumento das políticas globais de vigilância sanitária, com a elaboração de ações de controle da qualidade desde a sua etapa de produção<sup>7-12</sup>.

A Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) são os ensaios biológicos utilizados na avaliação da potência de heparinas não fracionadas em produtos farmacêuticos, tendo como base a ativação e aceleração *in vitro* de etapas da cascata proteolítica<sup>13</sup>. As leituras da

reação final desses ensaios se estabelecem em tempos ou em graus de coagulação, relacionados ao 5º Padrão Internacional de heparina de mucosa intestinal suína<sup>14-16</sup>.

O ensaio ICPO, preconizado pela Farmacopeia Brasileira, tem sido amplamente adotado para a avaliação de potência das HNF. O TTPA (também preconizado pela Farmacopeia Brasileira) é o teste mais comumente empregado para a avaliação das vias intrínseca e comum do modelo *in vitro* da cascata proteolítica, além da monitoração do uso de heparinas clássicas (não fracionadas) em pacientes em tratamento anticoagulante<sup>15</sup>. No entanto, até o momento, apenas o ICPO está implantado, sendo realizado rotineiramente pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e órgão de referência para as questões normativas e analítico-laboratoriais vinculados à vigilância sanitária.

O objetivo deste trabalho é fazer um estudo comparativo entre os métodos ICPO e TTPA, para verificar a eficácia da implantação do TTPA, como método para a avaliação da segurança e eficácia de heparinas não fracionadas em produtos farmacêuticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Avaliação dos métodos

Foram analisadas em quadruplicata pelos métodos do ICPO e TTPA, sem o conhecimento prévio de suas características (estudo cego), cinco amostras de heparinas não fracionadas, de diferentes fabricantes, provenientes de coletas realizadas por órgãos de vigilância sanitária, e suas potências foram determinadas em relação ao 5º Padrão Internacional de Heparina – WHO 97/578.

Para ambos os ensaios, suas metodologias foram avaliadas comparando-se os resultados estatísticos da exatidão (determinada pela percentagem de recuperação de uma diluição conhecida do 5º Padrão Internacional de Heparina em relação a ele mesmo) e pela repetibilidade ou precisão intraensaios (expressa pela variação nos resultados sob as mesmas condições de operação em um curto intervalo de tempo), sendo esses valores obtidos dividindo-se o desvio-padrão pela média, em relação às potências relativas das quatro repetições realizadas, em cada amostra, para ambos os métodos, por meio da determinação de seu coeficiente de variação (CV), expresso como percentagem (%).

Apenas para o ensaio do TTPA, avaliamos a linearidade (determinada a cada ensaio, sendo um dos

critérios para sua validação), sendo a amostra considerada satisfatória quando apresentou uma potência estimada em relação ao padrão de, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da potência declarada — de acordo com os parâmetros estabelecidos para a solução de heparina no 5º fascículo da Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, e pela OMS em relação ao critério de validação de metodologias<sup>14,17</sup>.

#### Método da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO)

O ensaio foi realizado de acordo com o POP INCQS nº 65.3320.005<sup>18</sup> e com a monografia descrita na Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte 2, fascículo 5<sup>14</sup>.

A potência da heparina foi calculada por meio de um ensaio biológico (ICPO) que compara o volume de uma solução amostra necessário para inibir a coagulação do plasma citratado de ovelha, recalcificado, com o volume da solução padrão de heparina necessário para produzir o mesmo efeito (com soluções padrão e amostra diluídas à mesma potência teórica).

Determina-se, na prática, o volume do padrão e da amostra – na presença de 1 mL de plasma ovino citratado e 0,2 mL de cloreto de cálcio 1% (P/V), em tubos de ensaio 13 × 100 mm, após 1 hora de incubação a 37 °C em banho-maria – concedendo-se três graus (0,25; 0,5; 0,75) entre zero e a coagulação total (1,00), que permitem o grau de coagulação 0,5, procedendo-se o registro dos resultados no protocolo de resposta (Tabela 1). Observando-se que, se a série das preparações não apresentar dois tubos com graduação acima de 0,50 e dois tubos com graduação abaixo de 0,50, o ensaio será repetido, usando-se soluções padrão e amostra com potência teórica ajustada.

No ensaio biológico da heparina pelo método ICPO, o intervalo entre o volume que permite a coagulação

e aquele que a inibe é tão pequeno que a curva dose-resposta não pode ser determinada diretamente. Utiliza-se, nesse caso, a interpolação do logaritmo do volume (x) correspondente a 50% da coagulação, tanto para o padrão quanto para a amostra. Sendo empregada para a análise dos resultados experimentais, determinação da potência e limites de confiança, análise estatística para o modelo de delineamento de médias móveis<sup>14</sup>.

#### Método do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

O ensaio foi realizado de acordo com a monografia descrita na Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte 2, fascículo 5<sup>14</sup>, — com exceção da utilização do plasma ovino citratado, que não apresentou resultados satisfatórios, sendo, portanto, substituído por plasma humano padrão<sup>19</sup>.

Com base na região linear da curva dose-resposta elaborada com o 5º Padrão Internacional de Heparina (Figura 1), selecionaram-se as concentrações: 2,0, 2,6 e 3,0 UI/mL.

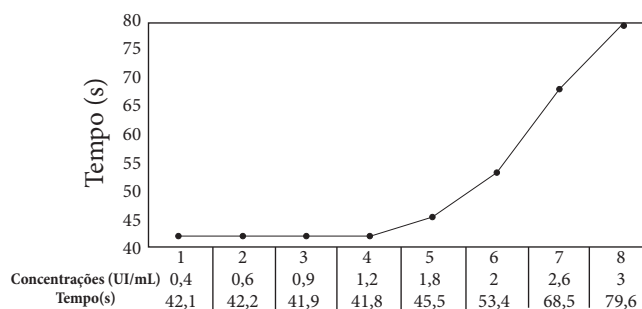


Figura 1. Curva Dose-Resposta de Heparina pelo Método TTPA

Foram incubados, em 6 tubos de ensaio 13 × 100 mm por 15 minutos, a 37 °C, 120 µL de plasma humano

Tabela 1. Protocolo de Respostas do Método ICPO

Tubo Nº	Vol.Heparina (mL)	Vol.Salina (mL)	Log vol x 10 x	Resposta de média pareada Xi	Graus de coagulação (Y)			
					Padrão		Amostra	
					Y	Yi	Y	Yi
1	0,8	0	0,9031	-				
2	0,78	0,02	0,8921	0,892				
3	0,76	0,04	0,8808	0,8807				
4	0,74	0,06	0,8692	0,8691				
5	0,72	0,08	0,8573	0,8572				
6	0,7	0,1	0,8451	0,8450				
7	0,68	0,12	0,8325	0,8324				
8	0,66	0,14	0,8195	0,8194				
9	0,64	0,16	0,8062	0,8060				
10	0,62	0,18	0,7924	0,7922				

Adaptado de POP/INCQS nº 65.3320.005

citrado liofilizado e 120 µL das respectivas soluções de heparina padrão e amostra (A1, A2, A3; P1, P2, P3). O plasma humano citratado liofilizado foi reconstituído com 1.000 µL de água deionizada, seguindo as instruções do fabricante.

Foram transferidas duas alíquotas de 100 µL de cada tubo de ensaio (duplicatas) para as cubetas de polietileno do coagulômetro (com manutenção da temperatura a 37 °C) e adicionados 50 µL de cefalina ativada. Após exatos 120 segundos, foram acrescentados 50 µL da solução de CaCl<sub>2</sub> 25 mM e o tempo de coagulação registrado. Todo o procedimento anterior foi repetido usando novas soluções padrão e amostra, outra alíquota de plasma, com incubação e ativação em ordem inversa à anterior (P1, P2, P3; A1, A2, A3).

Para a análise dos resultados experimentais e a determinação da potência das amostras para o método de análise de linhas paralelas em questão (ensaio 3 + 3 doses), foi realizada análise de variância. A validade de cada ensaio foi testada, e a potência de cada amostra estimada por meio de análise estatística para o modelo de delineamento totalmente ao acaso.

As condições de validade foram avaliadas por meio da análise dos resultados de regressão, desvio de paralelismo e desvio de linearidade (análise de curvatura quadrática e diferença de curvatura quadrática).

Toda a análise estatística foi realizada pelo Programa CombiStats® versão 4.0 da European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)<sup>20</sup>.

## RESULTADOS

O TTPA teve seus resultados para repetibilidade e precisão comparados analiticamente em relação aos do ICPO para a determinação da potência biológica de heparinas não fracionadas, conforme demonstrados na Figura 2.

### Avaliação estatística

Em uma amostragem estatística, o simples fato de um experimento poder apresentar variáveis contínuas ou discretas constitui um fator de seleção para a indicação de diferentes grupos de testes. Neste trabalho, optamos por aplicar os testes de hipótese paramétricos F da análise de variância (ANOVA) e *t* de Student, além do teste de hipótese não paramétrico de Mann-Whitney, já que o ensaio ICPO — por caracterizar-se pela leitura visual (qualitativa) dos graus de coagulação (0, 25, 50,

75 e 100%) — apresenta uma variável discreta, enquanto que o ensaio TTPA apresenta uma variável contínua, caracterizada pela leitura quantitativa de seus resultados (em segundos) obtidos no coagulômetro<sup>21</sup>.

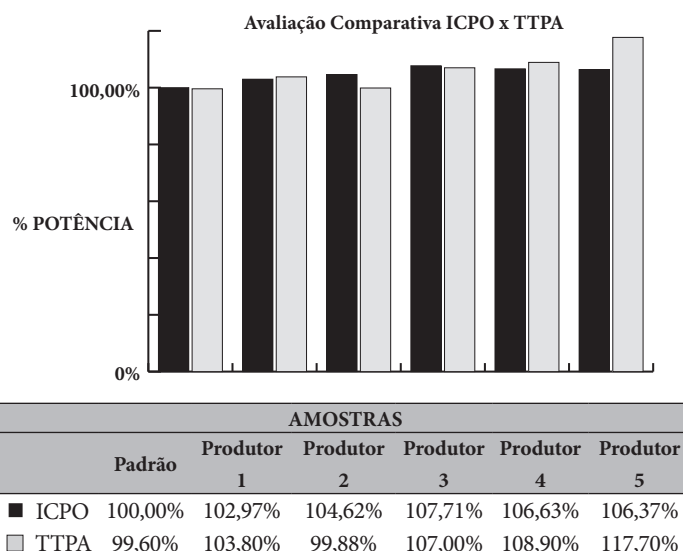


Figura 2. Resultados ICPO × TTPA

### Precisão dos métodos

Por meio da repetição dos ensaios analíticos que expressaram a variação nos resultados sob as mesmas condições de operação, observamos que o método ICPO apresentou precisão superior (CV entre 0,0% e 2,0%) em relação ao método TTPA (CV entre 1,80% e 4,98%), mas, mesmo assim, podemos considerar o TTPA preciso, pois seus valores de CV foram baixos<sup>22-25</sup>.

### Exatidão

Ambas as metodologias foram comparadas com o 5º Padrão Internacional de Heparina em relação a ele mesmo e os resultados (100 % ICPO e 99,60 % TTPA) apontaram como capazes de descrever com exatidão o valor da potência biológica de heparina<sup>22-25</sup>.

### Validação da metodologia TTPA

A análise do coeficiente de correlação de Pearson (*r*), entre as metodologias ICPO e TTPA (valor 0,65) indica uma correlação moderada entre os ensaios (Figura 3), provavelmente devido à técnica de leitura subjetiva do ensaio ICPO, comparado a uma leitura automatizada do ensaio TTPA, que apresenta uma gama maior de possibilidades de resultados e provavelmente alcançará

valores maiores se, a partir dos dados deste trabalho, um número maior de comparações for feito<sup>26</sup>.

Com base no coeficiente de correlação de Pearson, nos valores de % de recuperação, do CV e dos cálculos estatísticos ANOVA, Teste de Grubs, Teste t e Teste de Mann-Whitney, além do medicamento de referência apresentar resultado 100%, o ensaio TTPA apresentou uma variação satisfatória, de acordo com os padrões adotados pela Farmacopeia Brasileira e pela OMS, podendo ser considerado válido<sup>16,19, 22-25</sup>.

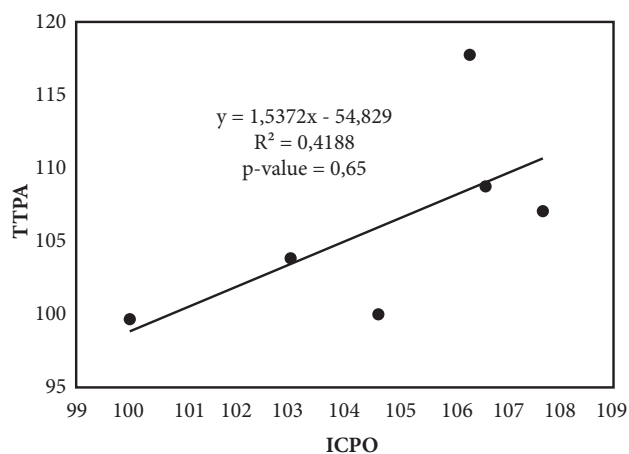


Figura 3. Correlação dos Resultados ICPO x TTPA

## DISCUSSÃO

Atualmente, o mercado mundial de heparinas apresenta um quadro extremamente complexo. A necessidade de um rigor crescente na análise das preparações de HNF (sobretudo nos EUA e na Europa) pode estimular produtores de países orientais a enviarem preparações de baixa qualidade para países pouco rigorosos em relação ao controle da qualidade desses produtos e fatos recentes no cenário mundial relacionados aos efeitos adversos referentes à utilização de heparina foram atribuídos à contaminação de suas preparações pelo sulfato de condroitina<sup>11,27,28</sup>.

A necessidade da implantação do TTPA para a avaliação da potência de heparinas apresenta uma série de justificativas. Uma delas é que, além de ser farmacopeico, este ensaio apresenta a vantagem de ser quantitativo, ou seja, pode ser realizado em um único dia, pois a medida do tempo para a formação de coágulos é realizada em coagulômetro, enquanto que o ICPO é qualitativo e leva em média cinco dias para sua conclusão, por adotar a observação visual e subjetiva da formação de coágulos.

Outro fator importante é que o TTPA é prescrito pela área médica na determinação da dosagem de heparinas a serem utilizadas nos pacientes, e a maioria dos laboratórios fabricantes no Brasil realiza sua avaliação da potência por meio desse método e não pelo ICPO (possivelmente pelos motivos anteriormente citados), o que certamente tem levado a divergências técnicas e, conseqüentemente, a variações nos resultados encontrados nos órgãos de vigilância sanitária – que utilizam apenas o ICPO como parâmetro analítico – sobretudo em situações de amostra única ou em casos de análise de contraprova.

Os pesquisadores afirmam que as heparinas são comprovadamente seguras para uso clínico, porém especialistas da área médica relatam reações adversas relacionadas à sua origem. De acordo com Dryjski e Dryjski<sup>29</sup> e Gomes e Braile<sup>30</sup>, a heparina de origem bovina é mais reatogênica que a suína, evidenciando clara diferença em relação a seus efeitos adversos, havendo também a necessidade de reajuste de dose e monitoração mais acurada quando da mudança do produto. Apesar de nossos resultados analíticos não apresentarem diferenças interensaios significativas, estudos de Robinson e Lewis<sup>31</sup>, Francis et al.<sup>32</sup> sugerem que as heparinas fabricadas a partir de vísceras de suínos devem ser a escolha ideal para utilização em cirurgias com circulação extracorpórea (CEC), por serem mais toleradas pelos pacientes devido à qualidade da matéria-prima. Tal conclusão, conseqüentemente, evitará problemas futuros em relação aos eventos adversos diretamente associados às dosagens das heparinas.

Os parâmetros de comparação numérica dos resultados finais dos ensaios pelo ICPO e TTPA aplicados foram os testes *t* de Student e *F* da análise de variância (ANOVA) ( $p = 0,27$  e  $p = 0,23$ , respectivamente), não utilizando as prerrogativas estatísticas habituais, pois, como mencionado anteriormente, suas metodologias são não paramétricas. Mesmo assim, ao encontrarmos os valores de  $p > \alpha (0,05)$ , demonstramos que os resultados obtidos em cada metodologia não são estatisticamente distintos.

O teste de hipótese não paramétrico de Mann-Whitney – aplicado em cada um dos sistemas ICPO e TTPA – demonstrou que o 5º Padrão Internacional de Heparina, a amostra de referência, o produtor 3 e o produtor 4 (Tabelas 2, 3, 5 e 6, respectivamente) apresentaram um *p* valor maior que 0,05, demonstrando que os ensaios não são estatisticamente diferentes.

As amostras dos produtores 2 e 5 (Tabelas 4 e 7, respectivamente), apesar de satisfazerem os critérios de

validação dos ensaios, apresentaram um p valor menor que 0,05, demonstrando que os referidos sistemas são estatisticamente diferentes. Esse fato pode ser explicado pela variação de pesos moleculares das amostras estudadas (originárias de produtores diferentes), como descrito por Melo et al.<sup>19</sup> em 2008. Esses autores afirmam que o peso molecular das preparações de heparina influencia diretamente no TTPA, e que frações de peso molecular menores são menos sensíveis a este ensaio. Essas observações constituem alerta aos profissionais da área clínica para alterações nas doses desse fármaco, em relação aos seus efeitos colaterais.

Em relação aos ensaios analíticos, Vaccari et al.<sup>15</sup> relataram, em 2003, que o ICPO fornece resultados de potência significativamente superiores (média de 10%) quando comparados ao TTPA. Nossos resultados não reproduziram a conclusão desse estudo já que, ao analisarmos os resultados inter-ensaios, observamos que os mesmos não apresentaram diferença significativa, pois, ao considerarmos todos os seis ensaios (104,72% e 106,15%, respectivamente), o TTPA apresentou 1,43% a mais que o ICPO e, quando consideramos apenas os quatro ensaios estatisticamente iguais (104,39% e 103,90%, respectivamente), o TTPA apresentou 0,5% a mais que o ICPO, com a precisão do TTPA apresentando um coeficiente de variação entre 1,8% a 4,98%, bem maior que o ICPO (0,1% a 2,0%), possivelmente devido à escala de leitura do ICPO ser menor (graus de coagulação) que o TTPA (tempos de coagulação).

## CONCLUSÃO

Em relação aos resultados analíticos, o ICPO, por ser um método qualitativo, apresentou sensibilidade limitada em comparação com o TTPA (método quantitativo), o que não o impede de continuar a ser utilizado normalmente pelos laboratórios de controle da qualidade das HNF.

O TTPA é um ensaio mais sensível que o ICPO e também pode ser adotado – conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira – pelos laboratórios de controle, para ser utilizado paralelamente como parâmetro analítico.

Quanto à avaliação da metodologia TTPA, o ensaio apresentou uma variação satisfatória, de acordo com os padrões adotados pela WHO, e pode ser considerado validado.

Reforçados pela confiança na análise laboratorial – ferramenta essencial para a detecção de alterações

da qualidade – relacionadas à avaliação comparativa proposta neste trabalho e por meio da utilização de parâmetros estatísticos, demonstramos claramente que o TTPA é a metodologia mais segura para uso nos laboratórios de controle da qualidade.

Consideramos que as HNF com matéria-prima de qualidade, pureza química garantida e isenção de contaminantes reproduzem resultados equivalentes pelas duas metodologias.

Entendemos que os resultados deste estudo fortalecerão o estabelecimento de uma regulamentação específica para a análise de preparações de heparina por métodos mais modernos e apropriados.

Observamos a importância da padronização dos procedimentos de desenvolvimento de novas metodologias e de harmonização que assegurarão a qualidade e eficácia clínica das HNF.

Por fim, consideramos que deve ser estimulada aos fabricantes a melhoria no controle da qualidade da produção das heparinas disponibilizadas no mercado, incentivando, paralelamente, a avaliação clínica por meio de critérios quantitativos das heparinas utilizadas na rede hospitalar e, principalmente, por meio de ações da Vigilância Sanitária, com a implementação de um sistema de notificação tanto na rede pública como na rede privada do Brasil.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; ao Ministério da Saúde e ao Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela revisão e sugestões da tradução em inglês.

---

## REFERÊNCIAS

1. Silva KR, Costa R, Rached RA, Martinelli Filho M, Caldas JGMP, Carnevale FC, et al. Warfarin prevents venous obstruction after cardiac devices implantation in high-risk patients: partial analysis. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(4):542-9.
2. Gracher AHP. Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidomicetos [tese de doutorado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2010.
3. Carvalho LCD. Inibidores seletivos da trombina, novo tratamento anticoagulante em doentes com fibrilação auricular. Aplicação do conceito dos três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva [tese de doutorado]. Porto. Universidade do Porto, 2011.
4. Harvey RA, Champe PC. *Farmacologia Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 1998.

5. Mauro MFZ, Wang R, Cristóvão SAB, Salman AA, Oliveira JB, Mangione JA. Novos inibidores da trombina: qual o estado atual das pesquisas? *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2004;12(3):130-7.
6. Junqueira DRG, Viana GT, Peixoto ERM, Barros FCR, Carvalho MG. Farmacovigilância da heparina no Brasil. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(3):328-32.
7. World Health Organization. A WHO Manual STEPS de acidentes vascular cerebrais: enfoque passo a passo para a vigilância de acidentes vascular cerebrais – 2005. [acesso 2012 Jul 29]. Disponível em: [<http://www.paho.org/portuguese/ad/dpc/nc/steps-stroke.pdf>].
8. Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, Naggi A, Viswanathan K, Bisio A, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotech*. 2008;26:669-75.
9. Nothenberg M. Heparina adulterada, mais um “negócio da china”. Química e Derivados [on-line], São Paulo, n. 471, 2008. [acesso 2012 fev 17]. Disponível em [<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd471/biofarma/biofarma.html>].
10. Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular – SBCCV. Boletim Científico Especial – Heparina 1 [on-line]. [acesso 2012 jul 31]. Disponível em: [[http://www.sbccc.org.br/medica/boletim\\_esp08\\_01\\_heparina.asp](http://www.sbccc.org.br/medica/boletim_esp08_01_heparina.asp)].
11. World Health Organization. A WHO Newsletter of National Drug Regulatory Authorities (DRAs) and WHO have issued international alerts, warning letters to health professionals and information about recalls regarding contaminated heparin sodium injections – 2008. [acesso 2012 jul 30]. Disponível em: [[http://www.who.int/medicines/publications/newsletter/PN2008\\_2.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/newsletter/PN2008_2.pdf)].
12. Wu C. China records 155% increase in heparin sodium exports for Q1 [on-line]. [acesso 2012 jan 09]. Disponível em: [<http://www.asia-manufacturing.com/news-328-heparin-sodium-pharmaceuticalexports-shenzhenhepalinkbiotech-news2.html>].
13. Carlos MML, Freitas PDFS. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. *Acta Vet Bras*. 2007;1(2):49-55.
14. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. Parte II, fasc. 5. São Paulo (SP): Atheneu, 2003.
15. Vaccari SF, Liberato BJ, Masiero SMK, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. *Rev Bras Hemat Hemot*. 2003;25(2):103-10.
16. United States Pharmacopeia. Heparin Information. [acesso 2012 ago 08]. Disponível em: [<http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>].
17. World Health Organization. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15 Validation of analytical assays [Press]. Genebra; 1997. p. 65-9.
18. Avaliação da Potência da Heparina Sódica – Método de Determinação do Grau de Inibição da Coagulação. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro (RJ): INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3320.005).
19. Melo EI, Pereira MS, Cunha RS, Sá MPL, Mourão PAS. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(2):169-74.
20. European Pharmacopoeia. Council of Europe [online] – EDQM. CombiStats v. 4.0. [acesso 2011 jul 10]. Disponível em [<http://www.combistat.eu/>].
21. Siegel S, Castellan Júnior NJ. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2006.
22. Dalmora SL, Junior LB, Vaccari SF, Fronza M, Oliveira PR, Rolim CMB. Validation of the anti-factor IIa assay and potency assessment of enoxaparin in pharmaceutical formulations. *Farmaco*. 2005;60(3):225–9.
23. Moura WC, Gallina NM F, Fuches RM M, Romijn PC, Leite JPG. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J Virol Meth*. 2008;154:7-13.
24. Dalmora SL, Souto RB, Silva LM, Lana AD, Schutkoski R, Vaccari SF. Biological potency evaluation and physicochemical characterization of unfractionated heparins. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(5):326-32.
25. Moura WC. Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva [tese de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, 2009.
26. Santos C. Estatística descritiva – Manual de Auto-Aprendizagem. Lisboa: Sílabo; 2007.
27. Cavalheiro Filho C, Chamone DAF, Rached RA, Maffei FH. Heparinas: momento atual. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6). [acesso 2012 jun 15] Disponível em: [[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302008000600001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000600001&lng=en&nrm=iso)].
28. Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *New Engl J Med*. 2008;358:2457-67.
29. Dryjski M, Dryjski H. Heparin induced thrombocytopenia. *Vasc Endovasc Surg*. 1996;11(3):260-9.
30. Gomes WJ, Braile DM. A busca de soluções para o problema das heparinas no mercado nacional. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;17(2):167-8.
31. Robinson JA, Lewis BE. Plasmapheresis in the management of heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 1999;36(1):29-32.
32. Francis JL, Palmer III GJ, Moroosse R, Drexler A. Comparison of bovine and porcine heparin in heparin antibody formation after cardiac surgery. *Ann Thoracic Surg*. 2003;75:17.



# Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV

## Assessing the effect of multiple freeze-thaw cycles on the stability of serum samples for anti-HIV antibody detection

RIALA6/1505

Márcia Jorge CASTEJON<sup>1\*</sup>, Rosemeire YAMASHIRO<sup>1</sup>, Camila Cardoso de OLIVEIRA<sup>2</sup>, José Carlos OLIVIERI<sup>2</sup>, Carmem Aparecida de Freitas OLIVEIRA<sup>1</sup>, Mirthes UEDA<sup>1</sup>

\*Endereço para Correspondência: <sup>1</sup>Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 10º andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. E-mail: mcastejon@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil  
Recebido: 28.05.2012 – Aceito para publicação: 18.07.2012

### RESUMO

No presente estudo foi investigado o impacto dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade das amostras de soro estocadas a -20 °C quanto à reatividade de anticorpos anti-HIV. As amostras analisadas foram provenientes de painéis de soros (constituídos de amostras anti-HIV positivo e negativo), produzidos no Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz (IAL), os quais têm sido material de referência para o preparo de amostras do controle de qualidade interno de testes imunodiagnósticos de HIV/Aids. A avaliação da estabilidade dos soros foi efetuada por meio de ELISA/EIA, Western blot e imunofluorescência indireta, em amostras submetidas a 11 consecutivos ciclos de congelamento e descongelamento, que variaram de 7 a 60 ciclos. Nenhum efeito estatisticamente significativo na reatividade dos anticorpos específicos foi observado. Portanto, o procedimento de congelamento e descongelamento, em até 60 ciclos, não causou efeitos adversos na reatividade das amostras de soro positivas para detecção de anticorpos anti-HIV, sem ocorrência de reações falso-negativas, tampouco de resultados falso-positivos em amostras negativas para HIV.

**Palavras-chave.** estabilidade, soro, anticorpos anti-HIV, temperatura, ciclos de congelamento-descongelamento.

### ABSTRACT

The present study investigated the impact of multiple and consecutive freeze-thaw cycles on the reactivity of anti-HIV antibodies in stored serum samples by using different methodologies for detecting the specific antibodies. The analyzed sera were part of serum panels (comprised of anti-HIV positive and negative samples), produced at the Center of Immunology – Instituto Adolfo Lutz, which have been the reference specimens for producing internal quality assurance sera of HIV/Aids immunodiagnostic assays. After performing every step of 11 consecutive and multiple freeze-thaw cycles procedure (varying from 7 to 60 cycles), the HIV antibody reactivity in the respective sera was evaluated by means of EIA/ELISA, Western blot and indirect immunofluorescence methodologies. No statistically significant effect on the specific antibody reactivity was found in sera after completing the freeze-thaw process up to 60 cycles. Neither false-negative reactions in HIV antibody positive sera, nor false-positive results in HIV-negative samples were detected.

**Keywords.** stability, freezing-thawing cycles, serum, anti-HIV antibody, temperature.

## INTRODUÇÃO

As amostras de materiais biológicos, tais como soro e plasma, coletadas e analisadas em estudos epidemiológicos ou clínicos, são habitualmente armazenadas para serem utilizadas em investigações múltiplas por um longo período de tempo. Os biobancos, coleções organizadas de material biológico humano<sup>1,2</sup>, são fontes fundamentais de informações científica e clínica, e também essenciais para desenvolver pesquisas nas áreas de doenças infecciosas e de produtos vacinais<sup>3</sup>. O armazenamento de materiais biológicos e a possibilidade de resgatá-los para fins de pesquisa ou para aprimorar a assistência médica com o desenvolvimento de inovações tecnológicas têm grande impacto no âmbito da saúde pública<sup>4</sup>.

O plano de gerenciamento da qualidade para boas práticas técnicas, nas etapas de transporte, preservação e armazenamento de amostras biológicas, tem sido desenvolvido com a finalidade de manter e assegurar a estabilidade dessas amostras, quando submetidas a outras análises e procedimentos<sup>5</sup>.

Os investigadores, que empregam as amostras de soros armazenadas em biobancos no desenvolvimento de seus estudos, devem ter conhecimento não apenas dos efeitos do armazenamento por longo prazo, mas também sobre o impacto que os ciclos múltiplos de congelamento e descongelamento possam ocasionar na estabilidade do soros<sup>6</sup>. Embora a necessidade de repetidos ciclos de congelamento e descongelamento em amostras de soro possa ser minimizada por meio do armazenamento de espécimes fracionados em vários recipientes de pequenas dimensões, frequentemente é necessário utilizar aquele determinado soro que já passou por um ou mais ciclos de congelamento e descongelamento<sup>7,8</sup>. Quando isso ocorre, os revisores de protocolos de pesquisa ou de manuscritos podem questionar a validade da análise de dados obtidos dessas amostras<sup>8</sup>.

Em virtude de frequentes e recorrentes ciclos de congelamento e descongelamento de amostras biológicas poderem causar efeitos adversos na viabilidade do material, é imprescindível que sejam desenvolvidos protocolos que possam assegurar que esse procedimento a ser aplicado possa sustentar a utilização dessas amostras<sup>9</sup>.

A estabilidade é essencial para qualquer padrão biológico, e desejável nos demais produtos biológicos<sup>10</sup>. As condições apropriadas de preparo e de armazenamento de amostra biológica favorecem a estabilidade e a

obtenção de resultados fidedignos em ensaios analíticos e, conseqüentemente, auxiliam ao clínico no diagnóstico e na decisão terapêutica<sup>11,12</sup>.

Em vista da escassez de dados disponíveis sobre o efeito adverso que os ciclos de congelamento e descongelamento dos soros possam causar na configuração e nos constituintes de anticorpos, esta investigação é particularmente relevante na execução de ensaios sensíveis, como os imunoenzimáticos (EIAs), os quais detectam estruturas proteicas propensas à desnaturação. Há, ainda, a preocupação com a prática de repetitivos ciclos de congelamento e descongelamento de amostras biológicas durante as investigações científicas, uma vez que esse procedimento pode causar eventual alteração dos resultados de um particular ensaio pela danificação física e conseqüente alteração bioquímica dos anticorpos de interesse<sup>3,13,14</sup>.

A estabilidade de uma molécula proteica biologicamente ativa depende, em especial, do ambiente e da exposição às condições que possam promover alterações químicas ou conformacionais. O processo de congelamento pode influir na estabilidade das proteínas pelo armazenamento em baixas temperaturas, que leva à formação de gelo com concentração de soluto, causada pela cristalização de água, e conseqüente mudança de pH<sup>13,14</sup>.

O conhecimento a respeito da influência do armazenamento por um longo período de tempo e sobre os ciclos de congelamento e descongelamento em amostras de soro é necessário para cada classe de anticorpo e tipo de ensaio utilizado, para garantir que os resultados obtidos em estudos prospectivos sejam fidedignos<sup>15</sup>.

A análise das amostras de soros armazenadas durante 25 anos a -25 °C no Janus Serum Bank (Noruega)<sup>16</sup> não mostrou diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de imunoglobulinas IgG e IgE, quando comparadas aos resultados obtidos anteriormente. Esse estudo demonstrou a inalterada estabilidade das imunoglobulinas presentes nos soros armazenados por um longo período de tempo em baixa temperatura, nas amostras analisadas em diferentes períodos de tempo de estocagem.

Fipps et al.<sup>17</sup> avaliaram o efeito do procedimento de 20 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento na reatividade dos anticorpos anti-HIV em amostras de plasma por meio de ELISA/EIA e Western blot, e observaram que não houve perda da

reatividade de anticorpos específicos nas amostras analisadas, tampouco a ocorrência de resultados falso-positivos em amostras negativas.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a estabilidade dos anticorpos anti-HIV em amostras de soro perante os múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento por meio de ensaios sorológicos sensíveis e específicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro analisadas neste estudo foram preparadas em fevereiro de 2011 e estabelecidas como materiais de referência para comporem os painéis de soros, constituídos de amostras anticorpos anti-HIV positivas e negativas, para serem incluídas nos ensaios sorológicos específicos como controle de qualidade interno (CQI HIV). Os soros foram obtidos por meio de processamento do plasma (bolsa de plasma) empregando-se técnica de trombinização<sup>18,19</sup>.

Antes do fracionamento dos soros em alíquotas, estes foram homogeneizados durante 120 minutos em agitador basculante (tipo gangorra). A seguir, as amostras foram distribuídas (volume 1 mL) em tubos para congelamento (“criotubos”), os quais foram etiquetados, numerados e armazenados a -20 °C em caixas para congelamento.

A composição dos painéis de soro foi executada seguindo-se os procedimentos operacionais padrão elaborado pelo Laboratório de HIV/Aids – IAL<sup>18</sup> e de acordo com normas de Boas Práticas de Laboratório para realizar fracionamento das amostras em alíquotas de soro, embalagem e rotulagem do produto<sup>20</sup>.

A caracterização desses soros quanto à reatividade para anticorpos anti-HIV foi efetuada pelo emprego de diferentes conjuntos de testes diagnósticos ELISA/EIA, Western blot (WB) e imunofluorescência indireta (IFI), utilizados no Laboratório de HIV/Aids do Centro de Imunologia – IAL (CIM-IAL) para detecção de anticorpos específicos. Os testes de esterilidade foram realizados nessas amostras em meios de ágar chocolate, ágar sangue, caldo BHI, ágar Sabouraud e ágar-ágar<sup>21</sup>.

A enumeração das amostras de soros negativos e positivos para anticorpos anti-HIV foi feita de acordo com a numeração sequencial já estabelecida para os lotes de painéis de soro produzidos no Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL, e os seguintes lotes foram constituídos:

- dois lotes de soro HIV positivo (soro fortemente reagente) – identificados pela numeração 067 e 075;
- dois lotes de soro HIV negativo – identificados pela numeração 063 e 065;
- dois lotes de soros HIV positivos (061 e 067) diluídos em soros negativos para o preparo do CQI (soro HIV fracamente reagente – baixo título de anticorpos). A numeração estabelecida para estes lotes foi de acordo com os soros positivos utilizados – CQI 061 e CQI 067.

Para produzir soros HIV fracamente reagentes, a diluição ideal das amostras foi estabelecida conforme o procedimento preconizado pelo Manual Técnico<sup>18</sup> pertinente ao preparo do CQI HIV positivo nas metodologias de ELISA/EIA, IFI e WB, seguindo-se a padronização aplicada no Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL.

Cada diluição da amostra foi testada no ELISA/EIA – Vironostika HIV Uni-Form II Plus O – Biomérieux, e a melhor diluição a ser empregada como CQI foi correspondente àquela que apresentou o valor da densidade óptica (DO) na faixa de 1,5 a 4,5 vezes o valor do *cut off* (CO) ou ponto de corte do teste<sup>18</sup>. Para WB e IFI, a diluição ideal definida foi a última de uma sequência de diluições dos soros em que ainda houve evidências de padrões de reatividade positiva para anticorpos anti-HIV.

Para cada ensaio estabelecido no estudo, foram selecionados 22 frascos de soro negativo – lote 063, soro fortemente reagente – lote 075 e soro fracamente reagente – CQI HIV 061 (diluído a 1:60.000 no ELISA, a 1:100 no WB e a 1:4 no ensaio de IFI); e, ainda, 11 frascos de soro negativo – lote 065, amostra positiva – lote 067 e CQI HIV 067 (diluído a 1:20.000 no ELISA, a 1:400 no WB e a 1:8 no ensaio de IFI).

Para constituir o subconjunto, composto por 22 ou 11 frascos de amostras de soro, foi realizada a amostragem aleatória, utilizando-se as ferramentas do programa Microsoft Office Excel.

Durante o período de dois meses, dos 22 frascos de amostras de soro selecionados de cada lote, 11 amostras foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento, e os demais 11 frascos de soro permaneceram armazenados a -20 °C, os quais foram denominados, respectivamente, como soros CD e amostras controle (AC). As amostras de soro CD foram retiradas do *freezer* e descongeladas totalmente

à temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos e, a seguir, congeladas novamente. O procedimento de congelamento/descongelamento (C/D) foi repetido até completar o número de ciclos previamente definido: 7-14-21-25-30-35-39-44-50-55-60. Após o término de cada ciclo definido de C/D, um dos frascos de cada lote de soro foi aleatoriamente escolhido para efetuar a avaliação de estabilidade da amostra. Nos dias de realização do ensaio de análise de estabilidade, a AC foi incluída no mesmo ensaio com os soros CD, para que fossem testados nas mesmas condições e, ainda, para evitar os efeitos de quaisquer variações que possam ocorrer na rotina diária do laboratório.

A estabilidade foi analisada nas amostras selecionadas em cada ciclo de C/D, avaliando-se a ocorrência ou não de variações de reatividade do analito (positividade ou negatividade de anticorpos anti-HIV) por meio de ELISA/EIA – Vironostika HIV Uni-Form II Plus O (Biomérieux SA, France), imunofluorescência indireta – IFI HIV-1 (BioManguinhos-FIOCRUZ, Brasil) e Western blot – Cambridge Biotech HIV-1 (Maxim Biomedical, Inc, USA), seguindo-se os procedimentos recomendados pelos fabricantes dos respectivos conjuntos de reagentes imunodiagnósticos.

No ELISA/EIA, o valor do ponto de corte (*cut off*) foi determinado em cada série de testes realizados e os resultados foram expressos pela razão entre a densidade óptica (DO) e o *cut off* (CO) – DO/CO do respectivo ensaio, para minimizar os efeitos de variações na metodologia.

Os resultados do ELISA/EIA foram avaliados pela análise de regressão linear em conjunto com a análise de variância fator único (One Way ANOVA)<sup>22-25</sup>, utilizando-se o programa Microsoft Office Excel.

Para estimar o número de ciclos de CD, acima de 60 ciclos, em que a amostra ainda poderia apresentar ausência de alteração na reatividade dos anticorpos anti-HIV, foi realizado o intervalo de predição com 95% de confiança para as retas de regressão utilizando-se o programa STATISTICA, versão 10.

A análise de dados foi efetuada por meio do programa STATISTICA, versão 10 e do Microsoft Office Excel.

Os resultados no Western blot foram analisados pela equipe técnica do Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL, por meio de classificação visual da intensidade das bandas gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24 e p17. Ademais, a reatividade foi examinada por comparação

com a intensidade da banda p24 exibida pelo soro controle positivo fraco inserido no respectivo conjunto de reagentes diagnóstico utilizado, e estabelecendo-se o seguinte critério: (1+) reatividade fraca (intensidade menor do que p24 do controle); (2+) reatividade igual ou superior; e (0) na ausência de bandas<sup>17</sup>.

Na IFI-HIV-1, a intensidade de fluorescência foi determinada comparando-se com os resultados demonstrados pela amostra controle positiva inserida no conjunto de reagentes e pelo CQI IFI HIV (soro HIV fracamente reagente), incluído rotineiramente em cada uma das reações IFI HIV-1 realizadas no Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL. O critério de análise estabelecido foi: reatividade (3+) para intensidade da fluorescência igual ou maior do que a do controle positivo do *kit* diagnóstico; reatividade (2+) fluorescência fraca para intensidade mais fraca do que a do controle positivo e igual ao do CQI IFI HIV; reatividade (1+) para fluorescência indeterminada, com intensidade de fluorescência mais fraca do que o CQI IFI HIV; e (0) ausência de fluorescência.

As amostras de soro selecionadas em cada ciclo de C/D foram analisadas nas três modalidades de testes imunodiagnósticos de detecção de anticorpos anti-HIV, acima mencionadas.

## RESULTADOS

Como parâmetros de avaliação dos efeitos adversos na reatividade de anticorpos anti-HIV nas amostras submetidas aos múltiplos processos de C/D, esses soros foram previamente caracterizados pelos mesmos ensaios empregados no estudo de estabilidade. As características de reatividade dos anticorpos anti-HIV nas seis amostras selecionadas estão descritas na Tabela 1.

As amostras de soro HIV positivo (fortemente reagente) dos lotes 067 e 075 apresentaram resultados reagentes acima do valor máximo de detecção estabelecido (DO >3,000) no espectrofotômetro de placas de ELISA – Organon Teknika Biomérieux – Reader 230. Por conseguinte, não foi exequível a realização da análise de regressão. Contudo, para os dados obtidos em amostras positivas fracamente reagentes (CQI 061 e 067), que demonstraram valores da razão DO/CO entre 1,5 a 4,5 vezes o valor do ponto de corte, a aplicação desse método estatístico foi factível.

Inicialmente, os resultados foram avaliados quanto à homogeneidade de variâncias e quanto à presença de valores aberrantes (*outliers*) individuais,

aplicando-se os testes de Cochran e Grubbs com 95% de confiança, respectivamente. Constatou-se que os dados provinham de uma distribuição com variâncias equivalentes (homocedásticas) e não foram encontrados valores aberrantes. Após verificar, por meio dos gráficos de resíduos, que os pressupostos para o uso da regressão linear foram atendidos, foi realizada a análise de regressão em conjunto com ANOVA.

Para aplicar a metodologia de análise de regressão linear nos resultados obtidos no ELISA/EIA, foi elaborada a tabela contendo os valores médios da razão DO/CO das triplicatas das amostras AC (armazenadas a -20 °C) e das amostras CD para cada lote de soro, conforme apresentados na Tabela 2.

A Tabela 3 mostra os resultados da análise de regressão dos valores médios da razão DO/CO das triplicatas das amostras submetidas aos 60 ciclos de CD e das amostras controles, de acordo com o lote de soro.

Nas Figuras 1 e 2, os valores médios (DO/CO) foram marcados de acordo com os ciclos de congelamento e descongelamento, e a reta de regressão foi construída para analisar as tendências significativas quanto à estabilidade dos anticorpos. As inclinações observadas foram testadas quanto à significância pelo valor-P.

Nas amostras de todos os lotes de soros analisados, que foram submetidas ao processo de CD bem como naquelas de controle, o valor-P (Tabela 3) do coeficiente da inclinação da reta de regressão foi maior do que 0,05. Portanto, a regressão não foi significativa e não apresentou tendência. Consequentemente, os valores médios da razão DO/CO dos soros não variaram em função dos ciclos, e foram considerados estáveis com nível de confiança equivalente a 95%.

A comparação direta dos valores obtidos no ensaio final das amostras (após 60 ciclos de CD) em referência aos valores iniciais de DO/CO (Tabela 1) demonstrou inexistência de variações na estabilidade dos soros que pudessem alterar a reatividade de anticorpos anti-HIV.

De acordo com os intervalos de predição da regressão, com 95% de confiança, o resultado obtido para o número de ciclos em que a amostra de soro poderia ser submetida sem afetar a reatividade dos anticorpos anti-HIV seria: 360 (soro negativo 063), 340 (soro negativo 065), 110 (CQI 067) e 88 (CQI 061). Importante ressaltar que há necessidade do monitoramento das amostras durante o período estimado para confirmar os dados estatísticos.

**Tabela 1.** Reatividade de anticorpos anti-HIV das amostras de soro nos testes imunodiagnósticos de ELISA - Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Western blot - Cambridge Biotech HIV-1 e IFI HIV-1 - Biomanguinhos/FIOCRUZ

Soros	Resultados			
	ELISA DO/CO	W blot	IFI	Interpretação
063	0,44	0	0	negativo
065	0,42	0	0	negativo
067	15,23	gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 *	3+	positivo (fortemente reagente)
075	15,23	gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 *	3+	positivo (fortemente reagente)
CQI 061	2,40	gp160(2+), gp120(2+), p66(1+), p51(1+), gp41(2+), p31(1+), p24(1+)	2+	positivo (fracamente reagente)
CQI 067	2,33	gp160(2+), gp120(2+), p66(2+), gp41(1+), p24(1+), p17(1+)	2+	positivo (fracamente reagente)

Wb: (0) ausência de bandas; (1+) intensidade fraca; (2+) intensidade forte

IFI: (0) sem fluorescência, (2+) fluorescência reatividade fraca; (3+) fluorescência reatividade intensa

\* todas as bandas apresentaram intensidade forte (2+)

**Tabela 2.** Resultados expressos pelo índice DO/CO, no ELISA - Vironostika HIV Uni-Form II Plus O - Biomérieux, calculados pelas médias dos valores das triplicatas nas amostras de soros AC\* e CD

Lote/Ciclo	Média das triplicatas (DO/CO)										
	7	14	21	25	30	35	39	44	50	55	60
CQI 061 CD	2,391	2,515	2,163	2,501	2,713	2,280	3,222	3,184	3,403	2,577	2,250
CQI 061 AC	2,301	2,452	2,335	2,431	2,627	2,385	3,123	3,137	3,013	2,606	2,536
CQI 067 CD	2,564	2,310	2,722	2,468	2,462	2,191	2,955	2,767	3,233	2,953	2,527
63 AC	0,311	0,266	0,350	0,335	0,291	0,348	0,327	0,325	0,340	0,329	0,310
63 CD	0,335	0,237	0,297	0,298	0,259	0,315	0,314	0,317	0,340	0,351	0,272
65 CD	0,276	0,278	0,325	0,323	0,272	0,292	0,269	0,278	0,340	0,322	0,272

\* Resultados nas amostras dos lotes CQI 061 e negativa 063, que permaneceram no freezer a -20 °C

**Tabela 3.** Análise de regressão dos valores médios das triplicatas das amostras de soros CQI 061, CQI 067, 063 e 065 submetidas aos 60 ciclos de congelamento e descongelamento e dos soros CQI 061 e 063 (amostras controles) armazenados a -20 °C

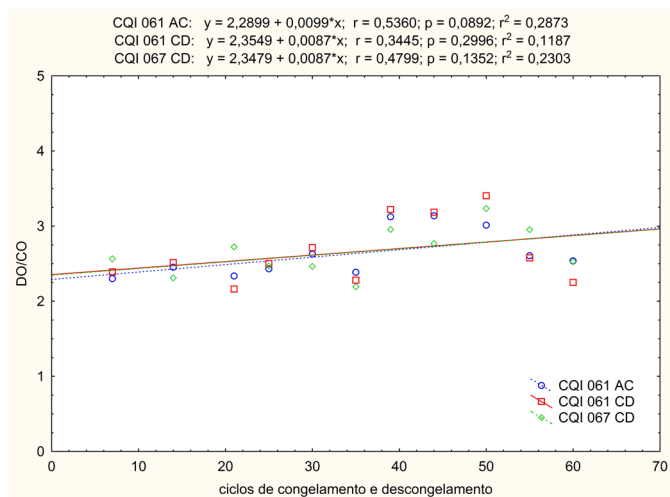
Estatística de regressão												
	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD									
R múltiplo	0,54	0,34	0,48									
R-Quadrado	0,29	0,12	0,23									
R-quadrado ajustado	0,21	0,02	0,14									
Erro padrão	0,28	0,42	0,29									
Observações	11	11	11									
ANOVA	gl	SQ			MQ			F de significação				
		CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD		
Regressão	1	0,28	0,22	0,22	0,28	0,22	0,22	0,089	0,300	0,135		
Resíduo	9	0,70	1,61	0,74	0,08	0,18	0,08					
Total	10	0,98	1,83	0,96								
	Coeficientes			Erro padrão			valor-P			Intervalos de confiança 95%		
	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD
Interseção	2,2899	2,3549	2,3479	0,1980	0,3005	0,2034	0,000	0,000	0,000	(1,842; 2,738)	(1,675; 3,034)	(1,887; 2,808)
Inclinação	0,0099	0,0087	0,0087	0,0052	0,0079	0,0053	0,089	0,300	0,135	(-0,002; 0,022)	(-0,009; 0,026)	(-0,003; 0,021)
Estatística de regressão												
	63 AC	63 CD	65 CD									
R múltiplo	0,29	0,29	0,15									
R-Quadrado	0,09	0,09	0,02									
R-quadrado ajustado	-0,02	-0,02	-0,09									
Erro padrão	0,03	0,04	0,03									
Observações	11	11	11									
ANOVA	gl	SQ			MQ			F de significação				
		63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD		
Regressão	1	0,0005	0,0011	0,0002	0,0005	0,0011	0,0002	0,381	0,382	0,657		
Resíduo	9	0,0058	0,0114	0,0069	0,0006	0,0013	0,0008					
Total	10	0,0063	0,0125	0,0071								
	Coeficientes			Erro padrão			valor-P			Intervalos de confiança 95%		
	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD
Interseção	0,3060	0,2822	0,2871	0,0180	0,0253	0,0197	0,000	0,000	0,000	(0,265; 0,347)	(0,225; 0,339)	(0,263; 0,350)
Inclinação	0,0004	0,0006	0,0002	0,0005	0,0007	0,0005	0,381	0,382	0,657	(-0,001; 0,002)	(-0,001; 0,002)	(-0,002; 0,001)

No Western blot não houve alteração de reatividade quanto aos parâmetros de presença e intensidade das bandas nas amostras após os ciclos de C/D, quando comparados aos padrões de bandas detectados na caracterização dos soros (Tabela 1). As bandas puderam ser claramente observadas nas fitas de nitrocelulose, mesmo após os 60 ciclos de procedimento de C/D. A invariabilidade de reatividade foi também detectada na IFI quanto aos parâmetros de intensidade ou ausência de fluorescência, respectivamente, nos soros anticorpos HIV positivo e negativo após os 60 ciclos de C/D.

Os soros negativos para anticorpos anti-HIV (lotes 063 e 065), incluídos na análise de estabilidade, indicaram a ausência de alteração de reatividade após serem submetidos aos múltiplos ciclos de C/D, a qual foi evidenciada pela não ocorrência de reações falso-positivas nas três modalidades de ensaios de detecção de anticorpos anti-HIV.

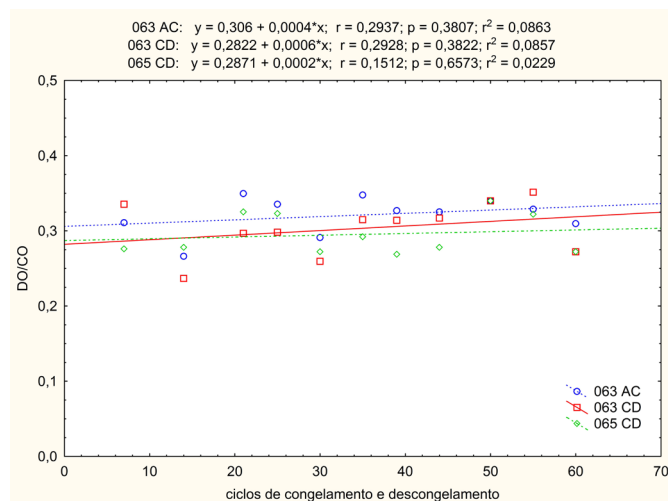
## DISCUSSÃO

Os biobancos são relevantes fontes de informação sobre as características biológicas, bioquímicas,



**Figura 1.** Gráfico da análise de regressão dos resultados médios (DO/CO) das triplicatas das amostras de soros CQI 061 e CQI 067 submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento e do soro CQI 061 armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (amostra de soro controle)

Ciclos CD: ciclos de congelamento e descongelamento; AC: amostra controle que permaneceu a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; DO/CO: razão entre a densidade óptica (DO) dividida pelo *cut off* (CO); r: coeficiente de correlação



**Figura 2.** Gráfico da análise de regressão dos resultados médios (DO/CO) das triplicatas das amostras de soros 063 e 065 submetidas aos 60 ciclos de congelamento e descongelamento e do soro 063 (amostra controle) armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Ciclos CD: ciclos de congelamento e descongelamento; AC: amostra controle que permaneceu a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; DO/CO: razão entre a densidade óptica (DO) dividida pelo *cut off* (CO); r: coeficiente de correlação

clínicas e científicas, os quais têm sido empregados como importante ferramenta no desenvolvimento de pesquisas clínico-laboratoriais de doenças infecciosas e de vacinas. Nesse contexto, o controle do processo pré-analítico é fundamental para os soros estocados, os quais serão utilizados em estudos retrospectivos e prospectivos ou para maximizar a informação de resultado laboratorial.

Embora os sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento das amostras de soro não tenham demonstrado evidente alteração na reatividade de anticorpos anti-HIV que pudessem causar efeitos adversos nos resultados, há vários outros fatores que induzem degradação das proteínas, como: tempo de armazenamento, preparo de diluições de soros (concentrações), amostras com hemólise e contaminação por micro-organismos. Por conseguinte, é recomendável armazenar os soros em pequenas alíquotas para evitar situações que possam prejudicar os resultados dos estudos.

Este estudo foi delineado com o propósito de investigar a invariabilidade das qualidades físico-bioquímicas e da característica de reatividade dos anticorpos anti-HIV em amostras preparadas para controle de qualidade interno. Pelo fato desses soros serem de baixa reatividade positiva, quaisquer alterações

nos seus componentes são facilmente percebidas no resultado final do ensaio. Pelo sistema de testes avaliados no presente estudo, a reatividade dos anticorpos anti-HIV foi mantida ao longo dos sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento (no máximo de 60 ciclos), sem ocorrência de reações falsamente positivas e negativas. O padrão de estabilidade dos soros quanto à reatividade de anticorpos anti-HIV permaneceu inalterado.

A realização de testes de detecção de anticorpos anti-HIV é especificamente complexa pelas implicações social e médica causadas perante falso diagnóstico laboratorial. Por conseguinte, é imprescindível a inclusão de amostras de controle de qualidade interno em cada ensaio sorológico específico executado nos laboratórios. Para tanto, é crucial a estabilidade dos constituintes do soro e da reatividade dos anticorpos específicos nas amostras de controle de qualidade interno utilizadas.

Nesse contexto, os conjuntos de amostras de soro utilizados como controle de qualidade interno nos ensaios sorológicos anti-HIV e pelo monitoramento dos lotes produzidos e distribuídos aos Laboratórios inscritos no Programa de Controle Qualidade Interno, bem como o sistema de uso dessas amostras para tal objetivo conforme as diretrizes estabelecidas pelo

manual técnico do IAL, estão adequados e confiáveis para a finalidade planejada.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o processo de congelamento e descongelamento das amostras de soro não afetou a estabilidade, quando foram analisadas por meio de diferentes metodologias sorológicas de detecção de anticorpos anti-HIV.

Embora nesta investigação não tenham sido realizados a dosagem de imunoglobulinas e os testes de diferença de ligação antígeno-anticorpo, foi evidenciado por meio dos resultados obtidos nas diferentes metodologias utilizadas que os ciclos de C/D aplicados não interferiram no desempenho das amostras quanto à reatividade de anticorpos. Para as amostras de soros estudadas, não houve ocorrência de reações falsamente negativas e resultados falso-positivos, o que indica a estabilidade dos soros após serem submetidos aos sucessivos e diferentes ciclos de C/D.

Este estudo demonstra a estabilidade dos anticorpos mesmo após 60 ciclos de congelamento e descongelamento desses soros, principalmente na detecção de anticorpos policlonais por meio de ensaios imunodiagnósticos, embora algumas proteínas tenham porventura sido degradadas parcialmente. Enfatiza-se que, neste estudo, foi realizado o procedimento de ciclos de C/D em número de vezes (60 ciclos) maior do que aquele realizado rotineiramente nos laboratórios, o que torna possível o emprego de soros congelados de biobancos para pesquisas futuras, também o seu uso como amostras de controle de qualidade interno.

A garantia de qualidade e a confiabilidade dos resultados em ensaios clínico-laboratoriais têm sido prioridades em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. A qualidade das amostras constituintes de painéis de soro para preparação de material de controle de qualidade interno está diretamente associada aos seguintes fatores: processo pré-analítico da amostra, mecanismos de degradação da amostra durante armazenamento e metodologias analíticas empregadas para a análise. A estabilidade dos anticorpos no soro em análise é o pré-requisito para o sucesso de trabalhos de pesquisa, pois constitui um importante parâmetro indicativo do grau de conservação da amostra e valida os resultados obtidos.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central – Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo.

Especial agradecimento para Dra. Alice M. Sakuma e Dra. Maria Cristina Duran, pesquisadoras do Centro de Materiais de Referência do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central, pelo grande apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Agradecemos ao André Rodrigues de Campos e Maria Cristina Sartorato, profissionais do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central – Centro de Imunologia, pelo excelente suporte técnico na condução deste estudo.

Agradecemos ao Dr. José Augusto Barreto e à Associação Beneficente para Coleta de Sangue (COLSAN), de São Paulo (SP), pelo apoio no fornecimento de bolsas de plasma descartadas.

Agradecemos à Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (SP), pelo apoio no fornecimento de bolsas de plasma descartadas.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. RDC nº 441, de 12 de maio de 2011. Aprova as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam o armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 jul. 2011. Seção 1, nº 136 .p. 60-1.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Estabelece as diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano com finalidade de pesquisa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil Brasília, DF, 15 set. 2011, Seção 1, nº 178 p. 40-2.
3. Pinsky NA, Huddleston JM, Jacobson RM, Wollan PC, Poland GA. Effect of multiple freezer-thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(1):19-21.
4. Prolla PA, Clausell N, Fernandes MS, Matte U, Bittelbrunn AC, Hemesath MP, et al. Biobanco do Hospital de Porto Alegre: aspectos técnicos, éticos, jurídicos e sociais. *Rev HCPA*. 2009;29(1):74-9.
5. Vaught JB, Caboux E, Hainaut P. International efforts to develop biospecimen best practices. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(4):912-5.
6. Krajden M, Minor JM, Rifkin O, Comanor L. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1683-86.
7. Hsing AW, Comstock GW, Polk BF. Effect of repeated freezing and thawing on vitamins and hormones in serum. *Clin Chem*. 1989;35(10):2145.



8. Comstock GW, Burke AE, Norkus EP, Gordon GB, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Effects of repeated freeze-thaw cycles on concentrations of cholesterol, micronutrients, and hormones in human plasma and serum. *Clin Chem*. 2001;47(1):139-42.
9. Campbell LD, Skubitz APN, Somiari SB, Sexton KC, Pugh RS. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). 2008 Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution Research. *Cell Preserv Technol*. 2008;6(1):3-58. [acesso 2012 jan 30]. Disponível em: [www.isber.org/bp/bestpractices2008.pdf].
10. Kirkwood TBL. Predicting the stability of biological standards and products. *JSTOR: Biometrics*. 1977;33(4):736-4.
11. Gray JJ, Wreghitt TG, McKee TA, McIntyre P, Roth CE, Smith DJ, et al. Internal quality assurance in a clinical virology laboratory. II. Internal quality control. *J Clin Pathol*. 1995;48:198-202.
12. World Health Organization – WHO. Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance. UNAIDS 01.22E, 2001.
13. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83(6):684-90.
14. Franks F. Protein stability: the value of “old literature”. *Biophys Chem*. 2002;96:117-27.
15. Kronenberg F, Lobentanz E-M, König P, Utermann G, Dieplinger H. Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein[a], apolipoproteins B and A-IV, total and high density lipoprotein cholesterol and triglycerides. *J Lipid Res*. 1994;35:1318-28.
16. Gislefoss RE, Grimrud TK, Mørkrid L. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(5):596-603.
17. Fipps DR, Damato JJ, Brandt B, Burke DS. Effects of multiple freeze thaws and various temperatures on the reactivity of human immunodeficiency virus antibody using three detection assays. *J Virol Methods*. 1988;20(2):127-32.
18. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de doenças. Manual técnico para implementação do controle de qualidade interno nos procedimentos laboratoriais para diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV no estado de São Paulo. São Paulo (SP): IAL; 2007. [acesso 2011 dez 6]. Disponível em: [http://bases.bireme.br].
19. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CAF, Campos AR, Sartorato MC, Cabral GB, et al. Implementação de controle de qualidade interno (CQI) nos ensaios sorológicos anti-HIV. Produção e distribuição de painéis de soro pelo Instituto Adolfo Lutz Central. *BEPA*. 2009;6(65):30-2.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998. Determina o cumprimento das diretrizes estabelecidas das boas práticas de fabricação e controle em estabelecimentos de produtos para diagnóstico in vitro. [acesso 2012 jan 18]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/686\_98.htm].
21. World Health Organization – WHO. General requirements for sterility of biological substances (Annex 4). Requirements for biological substances nº 6, 1973.
22. International Standards Organization – ISO. ISO Guide 35: Reference materials – general and statistical principles for certification, ISO. Genebra; 2006.
23. Cardoso MHW, Nóbrega AW, Vital HC, Abrantes SMP. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da estabilidade. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(2):439-46.
24. Altman DG. *Practical statistics for medical research. Comparing groups – continuous data*. Londres: Chapman & Hall; 1991. p. 179-320.
25. Ellison SLR, Barwick VJ, Farrant TJD. *Practical statistics for the analytical scientist – A Bench Guide. Analysis of variance*. Cambridge: RSC Publishing; 2009. p. 48-113.

## Estudo soropidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana

### Leptospirosis seroepidemiological study in horses used for urban traction

RIALA6/1506

Kelly CASELANI<sup>1\*</sup>, Paulo Roberto de OLIVEIRA<sup>2</sup>, Antonio Sergio FERRAUDO<sup>1</sup>, Anna Monteiro Correia LIMA-RIBEIRO<sup>2</sup>, Raul José Silva GÍRIO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14844-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: kellycaselani@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

Recebido: 27.10.2010 – Aceito para publicação: 26.06.2012

#### RESUMO

Este trabalho analisou a associação entre a ocorrência da leptospirose em equinos de tração em áreas urbanas do município de Uberlândia (MG), com os seguintes fatores de risco: presença de roedores, contato com outras espécies animais, local de repouso e manejo sanitário. A presença ou a ausência de anticorpos anti-*Leptospira* nas 79 amostras de sangue equino foi avaliada pelo teste de soroprecipitação microscópica (SAM) em campo escuro. As informações referentes à presença de roedores, contato com outras espécies animais, local de repouso e manejo sanitário foram obtidas por meio de questionário. As variáveis avaliadas, por serem do tipo categórico, foram submetidas à análise de correspondência múltipla. A taxa de positividade para anticorpo anti-*Leptospira* foi de 44,30%, e os sorovares mais encontrados foram: *icterohaemorrhagiae* (21,51%), *hardjo* (15,05%) e *castellonis* (10,75%). A presença de roedores, contato com outras espécies animais e ausência de manejo sanitário apresentaram associação com a infecção em equinos, e a alta frequência de aglutininas anti-*Leptospira* encontrada no soro sanguíneo demonstra a susceptibilidade destes animais aos sorovares de *Leptospira interrogans*.

**Palavras-chave.** *Leptospira interrogans*, equinos, sorologia, fatores de risco.

#### ABSTRACT

This study aimed at investigating the association of the occurrence of leptospirosis in horses employed for traction in urban areas of the city of Uberlândia-MG with the following risk factors: presence of rodents, contact with other animal species, resting place and sanitary management. The presence or absence of anti-*Leptospira* antibody was assessed in 79 horse blood samples by means of the microscopic agglutination test (MAT) in dark field. Information regarding the presence of rodents, the contact with other animal species, the resting place, and the sanitary management were obtained by means of a questionnaire. For being of categorical type, these variables were subjected to the multiple correspondence analysis. The rate of antibodies anti-*Leptospira* positivity was 44.30% and the most commonly found serovars were *icterohaemorrhagiae* (21.51%), *hardjo* (15.05%), and *castellonis* (10.75%). The presence of rodents, the contact with other animal species and the lack of sanitary management were associated with the horse infection, and the high frequency of anti-*Leptospira* agglutinins detected in serum samples from the analyzed horses showed that these animals are susceptible to the *Leptospira interrogans* serovars.

**Keywords.** *Leptospira interrogans*, horse, serology, risk factors.

## INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade infectocontagiosa dos animais domésticos, selvagens e do homem, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Constitui-se da zoonose mais difundida no mundo, de indiscutível interesse sanitário, econômico e social, sendo caracterizada por quadro clínico variável e, na maioria dos casos, assintomática<sup>1,2</sup>.

Possui distribuição geográfica cosmopolita, entretanto, a sua ocorrência é favorecida pelas condições climáticas e ambientais existentes nas regiões de clima tropical e subtropical, onde a elevada temperatura e os períodos do ano com altos índices pluviométricos favorecem o aparecimento de surtos epidêmicos, de caráter estacional<sup>3</sup>.

Não há transmissores especiais. Os reservatórios são animais domésticos, de maior significado epidemiológico, e silvestres portadores e convalescentes, que mantêm o agente nos rins. Nos ecossistemas rurais e urbanos, os principais reservatórios de leptospirosas são os roedores sinantrópicos, por terem capacidade de eliminar bactérias pela urina por muitos anos<sup>4</sup>. São susceptíveis todos os mamíferos domésticos, porém, os suínos e bovinos são mais afetados que os equinos, caprinos e ovinos<sup>5,6</sup>.

Os equinos podem apresentar uma forma clinicamente não sintomática, ou desenvolver uma forma aguda ou crônica<sup>7</sup>. A forma aguda, caracterizada por septicemia, encefalite, hepatite e nefrite é rara<sup>8</sup>. A manifestação clínica mais frequente é o comprometimento do globo ocular com vários graus de conjutivite, ceratite e uveíte, podendo evoluir para cegueira, devido à presença de leptospirosas no interior do globo ocular<sup>9</sup>. Abortos, parto de natimortos, doença neonatal e morte neonatal também têm sido verificados<sup>10</sup>.

Segundo Santa Rosa<sup>11</sup>, técnicas como exames microscópicos, cultivo, inoculação e pesquisa de anticorpos podem ser métodos eficientes de diagnóstico das leptospiroses. Embora muitos outros métodos indiretos venham a ser utilizados no diagnóstico, a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) em campo escuro é a mais realizada, pois tem alta sensibilidade, além de ser altamente específica<sup>12</sup>. A SAM pode ser extremamente útil em investigações epidemiológicas, sendo o método de preferência e o mais recomendado pela Organização Mundial da Saúde<sup>13</sup>.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos determinar a ocorrência da leptospirose em equinos de tração em áreas urbanas de Uberlândia

(MG), utilizando a SAM em campo escuro, e verificar a associação entre a taxa de positividade com os fatores de risco: presença de roedores, contato com outras espécies animais, local de repouso e manejo sanitário.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de abril a julho de 2007, entre colheitas de sangue e a realização da SAM. Foram utilizadas amostras de sangue de 79 equinos de tração em áreas urbanas, provenientes de Uberlândia, que prestavam serviço de frete. Do total de amostras, 16 foram realizadas no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia e 63, no Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose da Unesp de Jaboticabal.

O sangue foi colhido assepticamente pelo sistema Vacutainer, em tubos sem anticoagulante, numa quantidade de 5 mL. As amostras foram mantidas sob refrigeração em caixas isotérmicas, com temperatura em torno de -22 °C, até o momento das análises, sendo conduzidas aos laboratórios participantes do projeto. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 2.500 rotações por minuto, durante 10 minutos, para a obtenção do soro.

A análise das amostras de sangue foi realizada por meio da SAM, com antígenos vivos. Para isso, foram utilizados os sorovares: *autumnalis*, *australis*, *bataviae*, *bratislava*, *canicola*, *castellonis*, *cynopteri*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *panama*, *pomona*, *pyrogenes*, *tarassovi*, *sentot* e *wolffi*. As provas foram executadas de acordo com Santa Rosa<sup>11</sup>.

As estirpes de *Leptospira* spp. foram cultivadas em meio líquido STUART (Difco®), enriquecido com 10% de soro estéril de coelho, sendo repicadas semanalmente. O meio utilizado estava isento de anti-*Leptospira*, livres de contaminação e aglutinação, com 100 a 200 leptospirosas por campo.

As amostras de soros foram então diluídas em solução tamponada de Sorënsen, inicialmente na diluição 1:25. Dessa diluição, foram colocadas alíquotas de 50 µl em microplacas e adicionada igual quantidade de antígeno, resultando na diluição de 1:100 para triagem. A leitura das reações foi realizada em microscópio de campo escuro, após a incubação da mistura soro-antígeno por três horas em temperatura de 28 °C. O soro considerado reagente apresentou no mínimo 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospirosas aglutinadas no microscópio no aumento de 100 vezes<sup>14</sup>.

A análise do perfil epidemiológico (fatores de risco) foi obtida por meio de questionário, aplicado ao proprietário de cada animal. Foram obtidas as seguintes informações: presença de roedores (ROE: Sim ou Não), contato com outras espécies animais (CONT: Sim ou Não), local de repouso (LR: a) pasto ou b) terreno) e manejo sanitário (MAN: Sim ou Não). As correspondências entre taxa de positividade da leptospirose (LEPT: Sim ou Não) com os fatores de risco foram obtidas por análise de correspondência múltipla (ACM) utilizando a Matriz X'X (matriz de Burt), onde X é a matriz das informações originais formada por 0 (ausência) ou 1 (presença) do nível de cada fator de risco e X' é a transposta de X<sup>15</sup>. O teste qui-quadrado foi aplicado para verificar a significância estatística entre os fatores de risco e a presença da doença.

## RESULTADOS

Das 79 amostras de soro sanguíneo coletadas, 35 (44,3%) apresentaram reações positivas para uma ou mais sorovariiedades de leptospirosas, com títulos iguais ou superiores a 1:100.

A Tabela 1 apresenta a distribuição das sorovariiedades de *Leptospira interrogans* em ordem decrescente. Os sorovares *icterohaemorrhagiae* (21,51%), *hardjo* (15,05%) e *castellonis* (10,75%) foram encontrados com maior frequência, enquanto os sorovares *grippotyphosa* e *pomona* não reagiram para nenhuma amostra de soro sanguíneo.

Dos animais examinados que tiveram contato com roedores, 70% reagiram positivamente para leptospirose, evidenciando associação entre presença de roedores e soros reagentes para *Leptospira interrogans* ( $p < 0,05$ ). Ficou evidenciada também associação entre ocorrência da enfermidade e equinos que mantinham contato com outras espécies e a ausência de manejo sanitário ( $p < 0,05$ ).

A ocorrência da enfermidade não apresentou associação com equinos que convivem em pasto ou em terreno ( $p > 0,05$ ). No entanto, a taxa de ocorrência foi ligeiramente maior (51,43%) entre os animais que habitam terrenos, quando comparados àqueles que frequentam pastos (48,57%).

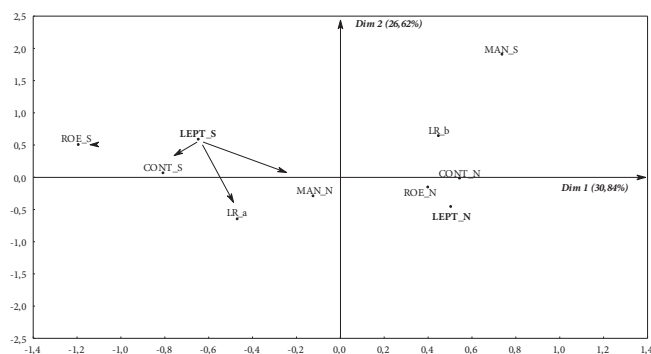
Essas associações foram confirmadas por análise de correspondência múltipla ao se considerar a estrutura multivariada contida nas informações. O mapa perceptual resultante conseguiu reter 57,56% (30,84% na dimensão 1 e 26,62% na dimensão 2) da inércia original (Figura 1). Os valores do qui-quadrado foram expressivos para as

associações: presença de roedores; contato dos equinos com outras espécies animais; e a ausência de manejo sanitário com a leptospirose. O valor do qui-quadrado responsável pela associação entre local de repouso-pasto e a enfermidade foi muito baixo e não significativo pelo teste univariado qui-quadrado, porém essa associação não pode ser desprezada, conforme se vê na Figura 1.

**Tabela 1.** Sorovares de *Leptospira interrogans* em equinos de tração em áreas urbanas, examinados pelo teste de soroprecipitação microscópica em campo escuro. Uberlândia, 2007

Sorovares	Número de reações <sup>a</sup>	Percentual
<i>icterohaemorrhagiae</i>	20	21,51
<i>hardjo</i>	14	15,05
<i>castellonis</i>	10	10,75
<i>pyrogenes</i>	8	8,6
<i>autumnalis</i>	7	7,53
<i>cynopteri</i>	7	7,53
<i>sentot</i>	7	7,53
<i>wolffi</i>	5	5,39
<i>australis</i>	4	4,3
<i>panama</i>	4	4,3
<i>bataviae</i>	2	2,15
<i>bratislava</i>	2	2,15
<i>canicola</i>	1	1,07
<i>hebdomadis</i>	1	1,07
<i>tarassovi</i>	1	1,07
<i>grippotyphosa</i>	-	-
<i>pomona</i>	-	-
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup> Um animal pode reagir positivamente a mais de um sorovar.



**Figura 1.** Mapa perceptual resultante da análise de correspondência múltipla, contendo a distribuição dos fatores de risco e da leptospirose em equinos utilizados na tração urbana em Uberlândia, em 2007. LEPT\_S: presença da leptospirose; LEPT\_N: ausência da leptospirose; ROE\_S: presença de roedores; ROE\_N: ausência de roedores; CONT\_S: contato com outras espécies animais; CONT\_N: ausência de contato com outras espécies animais; LR\_a) local de repouso - pasto; LR\_b) local de repouso - terreno; MAN\_S: presença de manejo sanitário; MAN\_N: ausência de manejo sanitário.

## DISCUSSÃO

Contrariamente ao encontrado neste trabalho, Giorgi et al.<sup>5</sup>, Chiareli et al.<sup>16</sup> e Siqueira<sup>17</sup> relataram prevalência mais baixa para leptospirose em equinos, de 4,53% em São Paulo, 5,9% em Minas Gerais e de 8% na Bahia, respectivamente. As frequências baixas encontradas nesses estudos podem ser explicadas pelas melhores condições sanitárias e de manejo a que os animais eram submetidos.

Resultado mais próximo ao da presente pesquisa foi obtido por Lilenbaum<sup>18</sup>, que descreveu 42,96% de éguas reagentes para leptospirose no Rio de Janeiro. As semelhanças se justificam pelas condições similares de exposição dos equinos às leptospirosas, uma vez que, em seu estudo, Langoni et al.<sup>8</sup> descreveram prevalência (62,54%) significativamente maior entre animais de trabalho, quando comparado a animais de esporte (47,10%), confirmando a importância das práticas de manejo como fator de risco na infecção por *Leptospira interrogans*.

Por outro lado, Pellegrin et al.<sup>19</sup> no Pantanal, e Aguiar et al.<sup>20</sup> na Amazônia, observaram altas taxas de infecção, 92,6% e 90,7%, respectivamente, fato esse atribuído às pastagens nessas regiões permanecerem inundadas durante vários meses do ano, associadas à presença de diversos portadores da fauna local – condição esta favorável à manutenção e disseminação das leptospirosas.

Segundo Barwick et al.<sup>21</sup>, altos percentuais de animais positivos poderiam refletir o manejo higiênico-sanitário deficiente, pois uma das principais fontes de transmissão é a urina que contamina o pasto, a água e os alimentos. Além disso, outros fatores estariam associados à manutenção dessa doença no meio ambiente, como: a aquisição de animais infectados; espécies diferentes criadas em áreas comuns; acesso a fontes de água contaminadas (riachos, rios, alagamentos); e a presença dos hospedeiros de manutenção, que poderiam ser animais domésticos, silvestres ou roedores sinantrópicos.

O sorovar *icterohaemorrhagiae* foi descrito como o mais evidente em equinos em diversos estudos soroepidemiológicos realizados no Brasil, como de Lilenbaum<sup>18</sup> no Rio de Janeiro; Favero et al.<sup>22</sup> em animais de diversas regiões do país; Langoni et al.<sup>8</sup> em São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul; e Hashimoto et al.<sup>23</sup> no Paraná, confirmando resultado encontrado neste trabalho. Lilenbaum<sup>18</sup> atribuiu o grande número de éguas positivas à manutenção dessa leptospira em roedores como principal fonte de contaminação para equinos.

A presença do sorovar *hardjo* difere dos resultados encontrados na literatura consultada<sup>8,18,22-24</sup>. Não era esperado que essa sorovariedade fosse uma das mais frequentes entre as pesquisadas em equinos, uma vez que esse sorovar possui os bovinos como hospedeiros de manutenção, sendo mais bem adaptada a essa espécie<sup>25</sup>. Alta frequência de animais positivos para *hardjo* foi evidenciada por meio de investigações realizadas por Pellegrin et al.<sup>19</sup> e Chiareli et al.<sup>16</sup>, os quais sugeriram que os bovinos poderiam contaminar o ambiente, transmitindo a infecção para os equinos. Os animais, objeto desse estudo, eram criados soltos, dividindo pastagens e bebedouros com bovinos, mantendo contato direto ou indireto com essa espécie, evidência que justificaria esse resultado.

Embora a maioria dos autores pesquisados não tenha registrado a sorovariedade *castellonis* entre as mais prevalentes, no presente trabalho foi verificado que 10,75% dos equinos apresentaram positividade para esse sorovar<sup>12,22,26</sup>. Hashimoto et al.<sup>23</sup> descreveram uma prevalência semelhante (10,22%), sugerindo a participação de bovinos na transmissão de *Leptospira* spp.

A despeito de ter sido observada associação entre a leptospirose em equinos e a presença de roedores, é possível compreendê-la considerando o sorovar *icterohaemorrhagiae* como o mais prevalente no presente estudo. Resultados estes que concordam com os obtidos por Favero et al.<sup>22</sup>, ao atribuírem a alta predominância do sorovar *icterohaemorrhagiae* à presença de roedores sinantrópicos.

A leptospirose é uma doença dependente de condições favoráveis para a sobrevivência do organismo no meio ambiente, entre elas o número de animais portadores em uma população<sup>27</sup>. Animais que mantiverem maior contato com outras espécies terão maiores chances de se contaminarem, uma vez que todos os mamíferos domésticos são susceptíveis, embora suínos e bovinos sejam mais afetados que equinos, caprinos e ovinos<sup>5,6</sup>. Lobo et al.<sup>28</sup> confirmaram os resultados dessa pesquisa em relação ao contato de equinos com outras espécies animais e a presença da doença, quando afirmaram que os animais domésticos são importantes reservatórios para leptospirose, devendo-se ressaltar ainda a possibilidade de intertransmissibilidade entre eles<sup>14</sup>.

A semelhança encontrada entre as taxas de ocorrência de leptospirose em equinos que habitam terrenos e que frequentam pastos pode ser explicada pelo manejo higiênico-sanitário deficiente em ambas. O pasto é uma das principais fontes de transmissão, quando

contaminado pela urina, além da água e alimento<sup>21</sup>. Deve-se também levar em consideração a grande capacidade de sobrevivência das leptospirosas em locais quentes e úmidos, proporcionado por esses ambientes.

A associação entre ausência de manejo sanitário e casos de leptospirose equina se deve a práticas inadequadas de manejo sanitário observadas, além do baixo nível de instrução dos proprietários, os quais dispunham de poucas informações sobre essa importante zoonose. Essa deficiência pode ter favorecido a disseminação da leptospirose entre esses animais. O baixo índice reagente à leptospirose, em um estudo realizado por Giorgi et al.<sup>5</sup>, foi explicado pelo fato dos animais da pesquisa serem cercados de cuidados especiais desde o nascimento até a idade adulta, principalmente na época da reprodução, permanecendo em ambientes que ensejam menores possibilidades de contato com leptospirosas.

## CONCLUSÃO

A ocorrência da leptospirose em equinos utilizados para tração urbana ficou associado aos fatores de risco: presença de roedores, contato com outras espécies animais e ausência de manejo sanitário.

A alta frequência de aglutininas anti-*Leptospira* encontrada no soro dos equinos evidencia a susceptibilidade destes animais aos sorovares de *Leptospira interrogans* e a necessidade de conscientização de carroceiros. Por se tratar de um problema de saúde pública, estudos adicionais devem ser realizados para se compreender melhor a epidemiologia da leptospirose em equinos que são utilizados em trabalhos de tração urbana.

## AGRADECIMENTOS

Aos proprietários dos animais, que gentilmente cederam as informações. Estes foram conscientizados dos resultados encontrados e receberam esclarecimentos e orientações. Aos laboratórios participantes do projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Saiz-Moreno L. Las zoonosis. Barcelona: Aedos; 1976.
2. World Health Organization. Leptospirosis worldwide. *Weekly Epidemiol Rec*. 1999;74:237-42.
3. Barcelos C, Lammerhirt CB, Almeida MAB, Santos E. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(5):1283-92.
4. Veronesi R. Doenças provocadas por Espiroquetídeos. *In: Doenças infecciosas e parasitárias*. 8ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1991. p. 565-80.
5. Giorgi W, Teruya JM, Macruz R, Genovez EM, Silva AS, Bongo F. Leptospirose em equinos: inquérito sorológico e isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de feto abortado. *Biológico*. 1981;47(2):47-53.
6. Santa Rosa CA, Castro AFP, Silva AS. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1969-1970;29-30:19-27.
7. Gírio RJS, Mathias LA, Lacerda Neto JC, Vasconcellos SA. Leptospirose experimental em equinos infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *copenhageni*. Aspectos clínicos e sorológicos. *Arq Inst Biol*. 1999;66(2):21-6.
8. Langoni H, Silva AV, Pezerico SB, Lima VY. Anti-*Leptospira* agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. *J Venom Anim Toxins*. 2004;10(3):207-18.
9. Valon F. Étude clinique, diagnostic et traitements des leptospiroses équine. *Prat Vet Equine*. 1998;30:7-14.
10. Pescador CA, Corbellini LG, Loretti AP, Júnior EW, Frantz FJ, Driemeier D. Aborto equino por *Leptospira* sp. *Cienc Rural*. 2004;34(1):271-4.
11. Santa Rosa CA. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev Microbiol*. 1970;1(2):97-109.
12. Caldas EM, Viegas EA, Reis RS, Massa LFM, Viegas SARA. Estudo comparativo entre estirpes de *L. interrogans* e *L. biflexa* no diagnóstico de triagem de leptospirose em animais. *Arq Esc Med Vet Univ Fed Bahia*. 1995-1996;18(1):126-41.
13. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:296-326.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de controle de zoonoses e animais peçonhentos. Manual de Leptospirose. Brasília, DF, 2. ed. 1995.
15. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black W, eds. Análise Multivariada de dados. 5ª ed. Porto Alegre (RS): Bookman; 2005.
16. Chiareli D, Moreira EC, Gutiérrez HOD, Rodrigues RO, Marcelino AP, Meneses JNC, et al. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em equídeos em Minas Gerais, 2003 a 2004. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;60(6):1576-9.
17. Siqueira CC. Leptospirose equina: estudo soroepidemiológico nas regiões metropolitanas de Salvador e Recôncavo Baiano [dissertação de mestrado] Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2012.
18. Lilenbaum W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1998;35(2):61-3.
19. Pellegrin AO, Silva RAMS, Ribeiro SC. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em equinos do Pantanal Mato-Grossense, sub-região da Nhecolândia. *In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Anais. Olinda: SPEMV; 1994. p. 190.
20. Aguiar DM, Cavalcante GT, Lara MCCSH, Villalobos EMC, Cunha EMS, Okuda LH, et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45(4):269-76.

21. Barwick RS, Mohammed HO, Atwill ER, McDonough PL, White ME. The prevalence of equine leptospirosis in New York State. *J Equine Sci*. 1998;9(4):119-24.
22. Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Morais ZM, Ferreira F, Neto JSF. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Cienc Rural*. 2002;32(4):613-9.
23. Hashimoto VY, Gonçalves DD, Silva FG, Oliveira RC, Alves LA, Reichmann P, et al. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007;49(5):327-30.
24. Gomes AHB, Oliveira FCS, Cavalcanti LA, Conceição IR, Santos GR, Ramalho EJ, et al. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em soro de equinos no estado da Bahia. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. 2007;8(3):144-51.
25. Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA, Montgomery J. Leptospiral infections in horses in Northern Ireland: serological and microbiological findings. *Equine Vet J*. 1983;15(4):317-20.
26. Abuchaim DM. Presença de aglutininas anti-*Leptospira* em soros de equinos no estado do Rio Grande do Sul. *Arq Fac Vet UFRGS*. 1991;19(1):9-14.
27. Hunter P, Herr S. Leptospirosis. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC, eds. *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford: Oxford University; 1994. v. 2. p. 997-1008.
28. Lobo EA, Tautz S, Lovatto PB. Caracterização do padrão sorológico em animais domésticos potencialmente transmissores da leptospirose no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. *Hora Vet*. 2003;23(134):29-32.

## Efeito da radiação gama sobre a contaminação da carne resfriada de cordeiro Santa Inês

### Effects of gama radiation on the bacterial contaminants of the refrigerated Santa Inês lamb meat

RIALA6/1507

Fernando Joaquim Xavier ALVES\*, Teófilo José Pimentel da SILVA, Robson Maia FRANCO

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ, Brasil, CEP 24230-340.

E-mail: feralves@vm.uff.br

Recebido: 27.02.2012 – Aceito para publicação: 30.09.2012

#### RESUMO

A irradiação é uma tecnologia alternativa para preservar alimentos, capaz de aumentar a segurança alimentar para o consumidor. Trinta e seis amostras de cortes de perna ou pernil com osso, congeladas a -18 °C, de seis cordeiros Santa Inês, abatidos em matadouro frigorífico sob inspeção estadual, foram analisadas. Essas amostras foram embaladas a vácuo, sendo 12 amostras controle, 12 tratadas com radiação gama na dose de 3 kGy e 12 com 5 kGy, e armazenadas em temperatura controlada de 0 a 2 °C. Foram realizadas contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas e enumeração de *Enterococcus* spp. nos dias 1, 15 e 30 de estocagem, e medição do pH. A análise estatística foi efetuada considerando-se o tratamento e o período de estocagem. Os valores da contagem de psicrotróficas e da enumeração de *Enterococcus* spp. foram maiores nas amostras controle, embora ainda em condições de consumo. Foram demonstrados valores de pH dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. O uso de radiação foi eficiente para tornar a carne mais segura e minimizar a proliferação bacteriana. O efeito da radiação não foi dose-dependente, e a exposição à radiação gama na dose de 3 kGy foi a mais indicada pelas mínimas alterações sensoriais no produto.

**Palavras-chave.** cordeiros, radiação gama, análises microbiológicas, qualidade da carne.

#### ABSTRACT

Food irradiation is used as an alternative procedure for preserving food, and to increase the food safety. Thirty-six samples of frozen vacuum-packed cuts of leg with bone (at -18 °C), from six Santa Inês lambs slaughtered in a slaughterhouse under state inspection, were used in this experiment. These samples divided into three groups, being 12 control samples, 12 samples irradiated with 3 kGy and 12 with 5 kGy. The samples were maintained refrigerated at 0 to 2 °C. The pH measurement, psychrotrophic heterotrophic aerobic bacteria plate counting and enumeration of *Enterococcus* spp. were carried out at day one, 15 days and 30 days of storage. The treatment and the storage period were included for statistical evaluation. The psychrotrophic counts and the enumeration of *Enterococcus* spp. showed higher values in control samples, although still in appropriate conditions for consumption. The range of pH values was within the established consumption limits. Irradiation was efficient, and this procedure promoted meat safety and minimized the bacterial growth. The radiation effect was not dose-dependent, therefore, the exposure to gamma radiation at 3 kGy dose would be the most suitable for minimizing the sensorial alterations of the product.

**Keywords.** lamb, irradiation, microbiological analysis, meat quality.



## INTRODUÇÃO

O ovino foi um dos primeiros animais a serem domesticados, sendo encontrado em diferentes áreas geográficas do mundo. O ovino da raça Santa Inês é de origem nordestina, oriunda do cruzamento das raças Bergamácia com a Crioula e Morada Nova, de grande porte e prolífera, bem adaptada aos climas quentes e com grande potencial para carne e pele<sup>1</sup>.

Por outro lado, o crescimento do número de casos de doenças transmitidas por alimentos por meio de agentes etiológicos nos últimos anos constitui uma preocupação das agências sanitárias e das indústrias de carne. A irradiação é uma tecnologia alternativa para preservação de alimentos, sendo adotada mundialmente. A legislação brasileira define irradiação de alimentos como o processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidades sanitárias, fitossanitária e/ou tecnológica<sup>2</sup>. Doses de 2 a 10 kGy de radiação ionizante na carne suína e de outros animais podem retardar o crescimento microbiano, levando a um retardamento na deterioração e putrefação das mesmas. A validade comercial também pode ser estendida pelo uso concomitante de irradiação e armazenagem sob refrigeração<sup>3</sup>.

A quantidade e o tipo de micro-organismos que se desenvolvem na carne dependem de vários fatores, como condições de abate, estresse dos animais, evisceração correta, entre outros<sup>4</sup>. *Enterococcus* spp. surge com muita importância em alimentos, devido à sua grande resistência a antimicrobianos, promovendo um aumento na proliferação de doenças veiculadas por alimentos, além de se envolverem em infecções hospitalares. São resistentes a baixas temperaturas (-5 °C), mas sua temperatura ótima de crescimento está em torno de 35 °C, o que não inviabiliza o seu crescimento a 0 °C<sup>5</sup>. Em um estudo, foram isoladas trinta amostras positivas para *Enterococcus* spp. em vários produtos, como cama de frango e peru e leite de vaca, resistentes a vários fármacos. Nas amostras, após isolamento com métodos bioquímicos, foram identificadas 25 como *Enterococcus gallinarum* e 9 como *Enterococcus faecalis*, sendo que a maioria foi resistente à vancomicina, gentamicina, streptomomicina, tetraciclina, etc<sup>6</sup>.

A contagem de bactérias psicotróficas é muito importante, pois muitas estirpes são responsáveis pela redução da validade comercial de alimentos e, conseqüentemente, sua deterioração. Micro-organismos psicotróficos são aqueles capazes de se multiplicar

em alimentos mantidos entre 0 °C e 7 °C, sendo sua temperatura ótima de multiplicação superior a 20 °C<sup>4</sup>. Entre essas bactérias, encontram-se as espécies responsáveis pela deterioração de alimentos cárneos e que, portanto, apresentam grande importância na redução do prazo comercial de alimentos refrigerados<sup>7</sup>. Sob condições tropicais, a carne fresca de cordeiros é altamente susceptível à contaminação microbiana e torna-se imprópria para o consumo após 16 a 18 horas. Quando mantida em temperaturas entre 0 e 3 °C, a deterioração ocorre em poucos dias, devido a multiplicação bacteriana, resultando em limosidade superficial, descoloração e odor desagradável. A irradiação pode reduzir a população bacteriana e aumentar a validade comercial da carne fresca de ovinos<sup>8</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da exposição da carne de cordeiro à radiação gama nas doses de 3 kGy e 5 kGy, com relação às mudanças bacteriológicas (bactérias psicotróficas e *Enterococcus* spp.) e alterações de pH ocorridas durante sua estocagem sob refrigeração em temperatura controlada de 0-2 °C por 30 dias.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no período de agosto a setembro de 2008, usando seis cordeiros abatidos aos seis meses de idade em um matadouro frigorífico sob inspeção estadual – SIE/RJ-553. Após o resfriamento das carcaças, as amostras de pernas ou pernis foram removidas e congeladas por 24 horas. As peças foram então serradas com serra fita, em porções de carne com osso na espessura de 5 a 10 cm, identificadas e embaladas individualmente a vácuo e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas diretamente para o Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados da Universidade Federal Fluminense, sendo mantidas à temperatura de congelamento (-18 °C) até o momento da irradiação.

Foram separados 36 cortes, sendo 12 irradiados com radiação Gama na dosagem de 3 kGy e 12 com 5 kGy, na Seção de Defesa Nuclear do Centro Tecnológico do Exército (CTEx), em Guaratiba (RJ), para tratamento por radiação gama emitida por uma fonte de <sup>137</sup>Cs (Césio-137). Os 12 cortes restantes foram utilizados como controle. As amostras irradiadas foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo para o laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foram armazenadas em geladeira com temperatura

controlada de 2 °C, visando a realização de análises bacteriológicas e de pH.

Inicialmente, foram aplicadas as técnicas de assepsia com álcool 70% na bancada e nas embalagens das amostras. Uma alíquota de 25 gramas foi retirada e homogeneizada por cinco minutos em 225 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1% em um stomacher, obtendo a diluição  $10^{-1}$ . Desse frasco, foram retirados 100  $\mu$ L, com pipeta esterilizada, e vazados em um endorff contendo 900  $\mu$ L de SSP a 0,1 % – e, assim, obteve-se a diluição  $10^{-2}$ . A partir desta, repetiu-se o procedimento, formando as demais diluições decimais  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ .

Para a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas<sup>9</sup>, após a obtenção das diluições, foi retirada, com pipeta esterilizada, uma alíquota de 200  $\mu$ L das três últimas diluições ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) e vazada 100  $\mu$ L em cada placa de Petri, com duplicata para cada diluição nas amostras controle. Para as amostras irradiadas, foram utilizadas apenas as duas primeiras diluições ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ). Utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade, foram vertidos nas placas aproximadamente 20 mL de ágar padrão contagem previamente fundido e mantido em banho-maria a aproximadamente 49 °C. Logo após ter sido vertido o ágar, homogeneizava-se o inóculo ao ágar com movimentos circulares sobre a bancada. Assim que o ágar semeado solidificava, as placas eram armazenadas em geladeira mantida à temperatura de  $6 \pm 1$  °C em posição invertida e colocadas em incubação por dez dias. Depois desse prazo, as placas eram removidas e selecionadas aquelas que apresentavam entre 25-250 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para contagem. O número de UFC contadas foi multiplicado por dez (devido ao uso de 100  $\mu$ L em vez de 1 mL para semeadura) e, pelo inverso do fator de diluição das placas escolhidas, obtinha-se a média das duas placas, expressando o resultado em  $\log_{10}$  UFCs/g.

Para a enumeração de *Enterococcus* spp., foi usada a técnica do Número Mais Provável (NMP)<sup>10</sup>. Uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada diluição foi inoculada em três séries de três endorffes, cada um com 1.000  $\mu$ L de caldo Chromocult Merck. Em ato contínuo, os endorffes foram incubados em estufa microbiológica a 45 °C por 48 horas. Resultados positivos foram devido à ação da azida sódica, que inibiu a microbiota acompanhante e ao substrato Bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -glucuronidase, que produziu uma coloração levemente azulada. Os resultados positivos de cada diluição foram comparados na Tabela de Mc Crady<sup>10</sup> e os resultados expressos em  $\log_{10}$  NMP/g.

Para análise de pH, após pesagem de cinco gramas da amostra em Becker, foi adicionado um volume de 50 mL de água recém destilada, homogeneizando com bastão de vidro. O pH foi determinado no 1º, 15º e 30º dias, em potenciômetro, com o cuidado de ajustar com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 antes do uso. Os resultados foram adotados de acordo com o seguinte critério<sup>11</sup>: pH até 6,2 – Carne boa para consumo; pH 6,4 – Carne para consumo imediato; e pH acima de 6,4 – Início de decomposição.

Os resultados das análises bacteriológicas (bactérias psicotróficas e *Enterococcus* spp.) e de pH foram tratados usando ANOVA em fatorial  $3^3$  (três tratamento e três tempos de estocagem), para testar o efeito da irradiação (tratamento), da estocagem e da interação entre estes. Os resultados que apresentaram diferenças significativas foram testados pela ANOVA segundo Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) por dose de radiação e tempo de estocagem, seguido do teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade<sup>12</sup>.

## RESULTADOS

Interpretando-se a Tabela 1, observou-se a evolução dos resultados das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas em amostras de perna ou pernil de cordeiros, submetidas a diferentes doses de radiação gama e tempos de estocagem.

**Tabela 1.** Valores médios das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas ( $\log_{10}$  UFC/g) das amostras resfriadas de 0-2 °C (controle, irradiada com 3 kGy e irradiada com 5 kGy) de pernas de seis cordeiros, em função do tempo de estocagem (1 dia, 15 dias e 30 dias)

Tratamento	Tempo de estocagem		
	1 dia	15 dias	30 dias
Controle	4,71 $\pm$ 0,09 <sup>aA</sup>	4,84 $\pm$ 0,06 <sup>aA</sup>	4,93 $\pm$ 0,07 <sup>aA</sup>
3 kGy	2,13 $\pm$ 0,35 <sup>aB</sup>	2,33 $\pm$ 0,13 <sup>aB</sup>	2,86 $\pm$ 0,21 <sup>aB</sup>
5 kGy	1,80 $\pm$ 0,45 <sup>aB</sup>	2,00 $\pm$ 0,16 <sup>aB</sup>	2,31 $\pm$ 0,05 <sup>aB</sup>

<sup>a</sup> Médias na mesma linha, seguidas de diferentes letras minúsculas diferem significativamente em relação ao tempo de estocagem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B</sup> Médias na mesma coluna, seguidas de diferentes letras maiúsculas diferem significativamente em relação ao tratamento ( $p < 0,05$ )

Verificou-se, na Tabela 2, a evolução dos resultados de Número Mais Provável (NMP) para *Enterococcus* spp. em amostras de perna ou pernil de cordeiros, submetidas a diferentes doses de radiação gama e tempos de estocagem.

**Tabela 2.** Valores médios da enumeração de *Enterococcus* spp. ( $\log_{10}$  NMP/g) das amostras resfriadas de 0-2 °C (controle, irradiada com 3 kGy e irradiada com 5 kGy) de pernas de seis cordeiros, em função do tempo de estocagem (1 dia, 15 dias e 30 dias)

Tratamento	Tempo de estocagem		
	1 dia	15 dias	30 dias
Controle	1,70 ± 0,93 <sup>aA</sup>	1,97 ± 0,81 <sup>bA</sup>	2,33 ± 0,73 <sup>cA</sup>
3 kGy	Ausência <sup>aB</sup>	Ausência <sup>aB</sup>	Ausência <sup>aB</sup>
5 kGy	Ausência <sup>aB</sup>	Ausência <sup>aB</sup>	Ausência <sup>aB</sup>

<sup>a</sup> Médias na mesma linha, seguidas de diferentes letras minúsculas diferem significativamente em relação ao tempo de estocagem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B</sup> Médias na mesma coluna, seguidas de diferentes letras maiúsculas diferem significativamente em relação ao tratamento ( $p < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

Com relação à contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas, observou-se que o processo de irradiação foi eficiente, pois diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a microbiota presente nas amostras submetidas às doses de 3 kGy e 5 kGy em relação as amostras controle (não irradiadas). A maior taxa de crescimento nas amostras irradiadas provavelmente deveu-se à menor população e, conseqüentemente, à menor competição entre as bactérias psicrotróficas. Constatou-se também que as amostras analisadas possuíam inicialmente uma boa qualidade em função das baixas contagens encontradas em todas as amostras.

Comparando o período inicial e final de estocagem a 0 a 2 °C por 30 dias, a contaminação por bactérias psicrotróficas não apresentou aumento significativo nas amostras irradiadas, corroborando o efeito preservativo da irradiação. Os resultados obtidos na contagem de bactérias psicrotróficas foram equivalentes aos encontrados em um estudo<sup>13</sup> que permitiu a seus autores atestar a eficiência do processo de irradiação, por meio da redução significativa de todas as contagens bacterianas em carne bovina “biltong” com o uso de radiação gama por Cobalto<sup>60</sup> na dose de 4 kGy. Os mesmos encontraram contagens de bactérias de até 7,21  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> após inoculação de culturas de *Staphylococcus aureus* nas amostras não irradiadas, enquanto que, em amostras irradiadas, as contagens não ultrapassaram os valores de 0,73  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Os resultados do presente trabalho também corroboram os resultados obtidos em estudos<sup>8</sup> realizados em laboratório e que permitiram a seus autores atestar que a carne de cordeiro irradiada com uma dose mínima de 2,5 kGy e conservada sob refrigeração entre 0 e 3 °C

apresentou validade comercial de cerca de quatro semanas, em relação a amostras não irradiadas e estocadas sob as mesmas temperaturas, que apresentaram uma validade comercial de cerca de duas semanas.

Observou-se também que a redução nos valores de Número Mais Provável para *Enterococcus* spp. ocorrida nas amostras irradiadas com 3 kGy e 5 kGy foi significativa em relação ao controle, diminuindo a microbiota presente nas amostras analisadas, mostrando a eficiência da irradiação. Tais resultados são semelhantes aos descritos em estudo<sup>14</sup> com amostras de mexilhões irradiados, tanto para amostras irradiadas com 3 kGy como para amostras irradiadas com 5 kGy. É importante frisar que o resultado encontrado e expresso como ausência indica que, na amostra, não se encontraram células capazes de promover a viragem do meio, modificando a coloração do meio de chromocult nos tubos de eppendorf, caracterizando-as como negativas ou ausência. Cabe ressaltar que, no Brasil, não há legislação estipulando limites para a presença de *Enterococcus* spp. em alimentos.

Evidenciou-se diferença significativa em relação ao pH nas amostras controle, entre os dias 1º e 30º de armazenamento, variando entre 5,77 no dia 1º a 5,65 no dia 30º. As amostras irradiadas não apresentaram diferença significativa de pH em relação à amostra controle e entre si, tanto em relação ao tempo de estocagem como em relação ao tratamento entre as amostras irradiadas e as não irradiadas. Foram observados valores entre 5,77 (dia 1º) e 5,69 (dia 30º) no tratamento com 3 kGy, e 5,78 (dia 1º) e 5,71 (dia 30º) no tratamento com 5 kGy, semelhantes aos encontrados em estudo<sup>15</sup> que permitiu ao autor atestar que não houve diferença significativa no pH entre amostras irradiadas e não irradiadas de carne bovina, suína e ovina. Os valores observados em todos os tratamentos e períodos de estocagem encontravam-se dentro dos valores admitidos para o consumo, considerado os parâmetros inclusos na legislação<sup>11</sup>.

## CONCLUSÃO

As contagens de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas possuíam valores maiores nas amostras controle, porém ainda dentro de valores adequados para o consumo. Entretanto, a irradiação com 3 kGy e 5 kGy reduziu em quase dois ciclos logarítmicos a população de bactérias psicrotróficas, tornando a carne mais segura para o consumidor. O tratamento por radiação ionizante

também foi eficiente para a inativação das bactérias do gênero *Enterococcus* no período de estocagem. Como não houve diferença significativa na redução da microbiota entre o tratamento com 3 kGy e o tratamento com 5 kGy, a dose de 3 kGy seria a mais indicada por não alterar significativamente as propriedades sensoriais do produto. Não houve alteração significativa de pH devido à irradiação. A carne de cordeiros permaneceu própria para o consumo durante todo o experimento.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Pesquisador do Setor de Defesa Nuclear do Centro Tecnológico do Exército (CTEx), Dr. Helio Carvalho Vital, ao CTEx, seus funcionários e pesquisadores, e ao matadouro frigorífico (SIE/RJ-553) no estado do Rio de Janeiro.

#### REFERÊNCIAS

1. Bressan MC, Prado OV, Perez JRO, Lemos ALSC, Bonagurio S. Efeito do peso ao abate de cordeiros Santa Inês e Bergamácia sobre as características físico-químicas da carne. *Cienc Tecnol Aliment*. 2001;21(3):293-303.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasil, Brasília, DF, 29 de janeiro de 2001, Seção 1, nº 20-E, p. 35.
3. Cheng A, Wan F, Xu T, Du F, Wang W, Zhu Q. Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situation and perspectives. *Radiat Phys Chem*. 2011;80(3):475-80.
4. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo (SP): Livraria Atheneu; 2001.
5. Domig KJ, Mayer HJ, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. sp 1. Media for isolation and enumeration. *Int J Food Microbiol*. 2003;88:147-64.
6. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol Cell Probes*. 2005;19:27-34.
7. Miyaguscú L, Chen F, Leitão MFF, Baffa O. Avaliação sensorial da vida útil de cortes de peito de frango irradiados. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23:7-16.
8. Chawla SP, Paul P, Thomas P, Babu Y, Sastry MD. Detection of irradiated lamb meat with bone: effect of chilled storage and cooking on ESR signal strength. *Int J Food Sci Technol*. 1999;34(1):41-5.
9. APHA. American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington-DC: APHA; 2001. pp. 63-7, 159-65.
10. Merck. *Microbiology Manual*. 12ª ed. Berlim; 2005.
11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº 1.236, de 02 de setembro de 1994, nº 1.812, de 8 de fevereiro 1996, nº 2.244, de 5 de junho de 1997, e nº 6.385, de 27 de fevereiro de 2008). DIPOA-MAPA, Brasília, DF, 2008.
12. Sas Institute. *SAS User's guide statistics*. Cary, 1999.
13. Nortjé K, Buys EM, Minnaar A. Use of  $\gamma$ -irradiation to reduce high levels of *Staphylococcus aureus* on casey-whein protein coated moist beef biltong. *Food Microbiol*. 2006;23(8):729-37.
14. Valente AM. Efeito da irradiação sobre mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: coliformes termotolerantes e *Enterococcus*; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2004.
15. Millar SJ, Moss BW, Stevenson MH. The effect of ionizing radiation on the colour of beef, pork and lamb. *Meat Sci*. 2000;55(3):349-60.

# Qualidade microbiológica da água utilizada para consumo humano na região do extremo oeste de Santa Catarina, Brasil

## Microbiological quality of water used for human consumption in the extreme western region of Santa Catarina, Brazil

RIALA6/1508

Diane SCAPIN<sup>1\*</sup>, Eliandra Mirlei ROSSI<sup>1,2</sup>, Débora ORO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina. Rua Oiapoc, 211, Bairro Agostini, CEP: 89900-000, São Miguel do Oeste, SC, Brasil. Fone: (049) 3631-1066. E-mail: dianescapin2005@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS)

Recebido: 16.12.2011 – Aceito para publicação: 26.07.2012

### RESUMO

No presente estudo, foi avaliada a qualidade microbiológica da água consumida pela população na região do extremo oeste do estado brasileiro de Santa Catarina. Essa região é essencialmente agrícola, com atividades de bovinocultura e suinocultura, fatores que podem influenciar na qualidade microbiológica da água – principalmente porque, muitas vezes, esses mananciais não são adequadamente protegidos e os dejetos são incorretamente descartados. Foram avaliadas 298 amostras de águas de diversas propriedades dessa região entre os anos de 2007 a 2010. As análises microbiológicas (coliformes totais e termotolerantes) foram realizadas pela técnica de fermentação em tubos múltiplos, conforme a metodologia prescrita pela APHA (1998), segundo a Instrução Normativa 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Das 298 amostras avaliadas, 191 (64,1%) estavam impróprias para o consumo humano, conforme os padrões bacteriológicos estabelecidos pela portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. Das amostras analisadas, 191 (64,1%) continham coliformes totais e 168 (56,4%) coliformes totais e termotolerantes. Esses resultados são preocupantes, e mostram a necessidade de ferramentas como a adoção de medidas preventivas e o tratamento adequado das águas comprometidas, para evitar a ocorrência de enfermidades de veiculação hídrica.

**Palavras-chave.** coliformes, contaminação, micro-organismos patogênicos.

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the microbiological quality of water consumed by the population in the far western region of the state of Santa Catarina, Brazil. This region is primarily agricultural with cattle and swine production activities, factors that can influence on the microbiological water quality, mainly because usually these sources are not adequately protected and the waste are incorrectly discarded. Two hundred and ninety-eight water samples collected from several area in this region were evaluated from 2007 to 2010. Microbiological analyzes (total and fecal coliforms) were performed by means of multiple tube fermentation technique, as prescribed by the APHA (1998), according to Instruction 62, August 26, 2003 – Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Of 298 samples, 191 (64.1%) were inappropriate for human consumption, according to the bacteriological standards established by Decree 518/2004 of the Brazilian Ministry of Health. Of the analyzed samples, 191 (64.1%) showed total coliforms, and the total and themotolerant coliforms were detected in 168 (56.4%) samples. These results are worrisome, and indicate that the preventive measures and adequate water treatment need to be implemented for preventing the occurrence of waterborne diseases.

**Keywords.** coliforms, contamination, pathogenic microorganisms.

## INTRODUÇÃO

O acesso à água potável é uma necessidade básica e essencial para a saúde e o bem-estar da população humana<sup>1</sup>. Há muitos anos, o uso de fontes de água subterrâneas rasas para consumo humano é uma prática comum de muitas comunidades de baixa renda em vários países<sup>2</sup>. No entanto, um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo é a contaminação bacteriológica da água<sup>3</sup>.

Segundo Ashbolt<sup>4</sup>, a água utilizada para o consumo humano, quando contaminada, pode ser causa de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna de fundamental importância a avaliação de sua qualidade microbiológica. Estudos epidemiológicos demonstram que a ingestão de águas que contenham elevadas concentrações de coliformes aumenta o risco de contrair doenças gastrointestinais como cólera, febre tifoide, diarreia, amebíase, salmonelose e outras<sup>4</sup>.

A presença de fezes na água pode favorecer a contaminação com micro-organismos, que pode ocorrer por vários mecanismos<sup>5</sup>. Em áreas rurais, destacam-se o destino final do esgoto doméstico e industrial em fossas sépticas, a disposição inadequada de resíduos sólidos urbanos e industriais, a utilização de poços antigos, inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais<sup>3</sup>. Além disso, segundo Conboy e Goss<sup>6</sup>, a deposição diária de resíduo orgânico animal no solo é também uma prática muito disseminada no meio rural, que aumenta o risco de contaminação das águas subterrâneas.

Outro fator que contribui para contaminação das águas é a falta de proteção encontrada próximo aos mananciais, o que evidencia a necessidade de um trabalho de orientação para os consumidores, com o objetivo de manter sua qualidade microbiológica<sup>7</sup>.

A falta de saneamento básico nas áreas urbanas e rurais é uma das principais causas da grande quantidade de águas contaminadas no Brasil. Estudos realizados no extremo oeste de Santa Catarina revelaram que essa região apresenta elevada contaminação dos mananciais hídricos<sup>8-11</sup>. Esse problema é observado principalmente no meio rural, segundo Silva et al.<sup>9</sup>, que, em estudo realizado no interior do município de Descanso (SC), verificaram 98,6% de amostras impróprias para consumo.

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica da água consumida pela população do extremo oeste do estado de Santa Catarina. Embora análises de água dessa região não sejam

realizadas regularmente, a maioria da população acredita estar bebendo água de ótima qualidade, principalmente por associar características como cor e odor à qualidade microbiológica da água.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 298 amostras de águas provenientes de diversas propriedades do extremo oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, entre 2007 e 2010. As amostras foram coletadas assepticamente, mantidas sob refrigeração e transportadas para o Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Campus de São Miguel do Oeste, para análise.

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: teste presuntivo para coliformes, teste confirmatório para coliformes totais e teste confirmatório para coliformes termotolerantes, pela técnica de tubos múltiplos, conforme a metodologia descrita pela APHA (1998), segundo Instrução Normativa nº 62/2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento<sup>12</sup>. Os resultados foram expressos em NMP/100 mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram 191 amostras (64,1%) impróprias para o consumo humano, conforme os padrões bacteriológicos estabelecidos pela Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde<sup>13</sup>, que determina ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL de água (Tabela 1). A Tabela 1 também demonstra que o ano de 2007 teve o maior número de amostras contaminadas (77,88%).

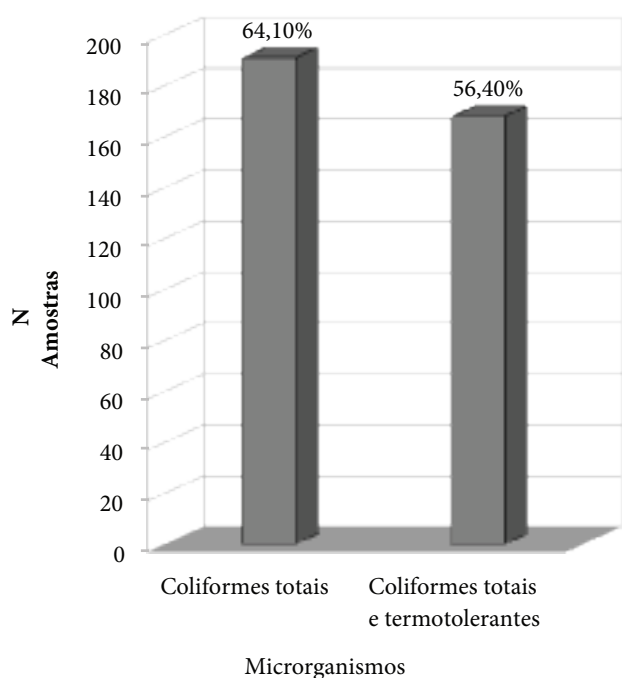
**Tabela 1.** Número de amostras impróprias para consumo humano durante os anos avaliados

2007	2008	2009	2010
88 (77,88%)	34 (54,84%)	54 (63,53%)	15 (38,46%)
Total de amostras impróprias: 191 amostras			

A alta quantidade de micro-organismos do grupo coliformes na água de consumo indica a contaminação fecal e a possibilidade de micro-organismos patogênicos estarem presentes nessa água, que pode desempenhar um papel intermediário na transmissão de patógenos responsáveis por diversas doenças em humanos e animais<sup>3,4</sup>.

Das amostras impróprias, 168 (56,4%) continham coliformes totais e termotolerantes (Figura 1). Esses

resultados corroboram com outras pesquisas realizadas na região<sup>10,11</sup>, uma vez que a maioria dos poços analisados encontra-se com contaminação microbiológica, o que os tornam impróprios para o consumo humano segundo a Portaria nº 518/2004 (MS). Dentre as pesquisas realizadas, destacamos aquela realizada por Rohden et al.<sup>11</sup>, que observaram dados semelhantes, em 2005, quando 54,7% das amostras avaliadas estavam impróprias para consumo humano e, em 2006, esse percentual foi de 56,7%, e a realizada por Malheiros et al.<sup>10</sup>, que demonstraram que 75,94% das amostras de águas subterrâneas provenientes de diversas propriedades rurais dessa mesma região estavam impróprias para o consumo humano. Esses pesquisadores destacaram que a contaminação ocorreu tanto nos poços superficiais (95,2%) quanto em poços semiartesianos e profundos (45,3%). Estes demonstraram a presença de coliformes totais em 153 amostras (95,03%) e de coliformes termotolerantes em 114 amostras (70,81%).



**Figura 1.** Número de amostras contaminadas por coliformes totais e termotolerantes

Os resultados encontrados em nosso estudo refletem a situação de risco em que se encontra a maioria dos mananciais subterrâneos da região do extremo oeste de Santa Catarina, uma vez que é comum a utilização de água subterrânea, de poços comunitários ou particulares, como principal fonte de abastecimento.

Diversos estudos demonstram que a contaminação de águas é um problema em diversas regiões do país, principalmente quando não há tratamento prévio antes do consumo. Para Xavier et al.<sup>14</sup>, aproximadamente 90% das amostras de água utilizadas em comunidades rurais da cidade de Tuparetama (PE) estavam em desacordo com a legislação vigente<sup>13</sup> e consideradas impróprias para o consumo humano. Para esses pesquisadores, a elevada contaminação microbiológica da água para consumo pode dever-se à falta de educação sanitária e de um sistema de esgotamento sanitário adequado.

Esse problema também é verificado em vários locais do mundo. O estudo de Suthar et al.<sup>3</sup> avaliou 86 amostras de água de poços, coletadas em áreas rurais de Rajasthan, Índia, e verificou que as fontes de água estavam severamente contaminadas nessa região, onde 78% apresentaram coliformes termotolerantes.

Verificamos que a maioria da população normalmente não filtra e nem ferve a água antes de consumi-la. Malheiros et al.<sup>10</sup>, em estudo realizado na mesma região, observaram que apenas parte da população filtra (10%) ou ferve (8%) a água antes de beber, pois acreditam que, por utilizarem água proveniente de fontes ou poços, estão consumindo uma água de ótima qualidade, uma vez que associam as características visuais (cor, odor e gosto) como fatores determinantes de potabilidade. Dados semelhantes foram verificados por Amaral et al.<sup>7</sup>, para os quais 100% das pessoas entrevistadas consideraram a água de suas propriedades de boa qualidade, o que justificou a ausência de qualquer tratamento da água previamente ao consumo e o pequeno número de residências que utilizavam filtros. Esse comportamento, segundo esses pesquisadores, pode estar associado ao consumo da água das fontes por longos períodos sem a ocorrência de doenças de veiculação hídrica, somado ao bom aspecto da água, que proporciona aos consumidores uma sensação de pureza.

Nossos resultados demonstraram que a região do extremo oeste de Santa Catarina enfrenta o problema de uma alta porcentagem de mananciais contaminados por micro-organismos. Essa contaminação pode ser atribuída a diversos fatores, destacando a pouca disponibilidade de água, a baixa qualidade das fontes, a inadequada deposição de resíduos humanos, animais e domésticos, a falta de saneamento e de proteção das fontes e as práticas de higiene pessoal inadequadas como os principais fatores responsáveis pela má qualidade da água em propriedades rurais<sup>3,7,15</sup>. É importante destacar

que o consumo dessa água pode causar sérios problemas de saúde para as pessoas que residem nessas áreas, especificamente em crianças<sup>3,4</sup>, uma vez que doenças podem ser causadas por micro-organismos patogênicos transmitidos pela água e, por essa razão, é necessário demonstrar aos consumidores a importância de algum processo de desinfecção para minimizar o risco de veiculação de enfermidades.

Ações que visem recuperar e preservar as fontes de águas superficiais e manter o padrão de qualidade das águas subterrâneas são imprescindíveis para garantir à população o direito de consumir água potável. Portanto, as autoridades devem tomar medidas preventivas para fornecer à população água de boa qualidade, tanto no meio urbano como rural, uma vez que encarregar os próprios consumidores de controlar a qualidade da água pode ser um problema, pois possuem pouco conhecimento quanto aos riscos que o consumo de água contaminada pode oferecer à saúde<sup>7</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que a água utilizada nas propriedades rurais do extremo oeste de Santa Catarina estão contaminadas por micro-organismos, uma vez que 64,1% das amostras analisadas estavam impróprias para o consumo humano, conforme os padrões estabelecidos pela Portaria nº 518/2004 (MS).

Além disso, conclui-se que os resultados encontrados podem estar associados à falta de saneamento básico em áreas urbanas e rurais, pois não há tratamento de esgotos na região e, na maioria das vezes, os mesmos são descartados de forma incorreta, o que pode afetar a qualidade dos mananciais hídricos.

Desse modo, observa-se que é necessário a adoção de medidas preventivas, visando à preservação das fontes de água, e o tratamento das águas já comprometidas como ferramentas necessárias para diminuir consideravelmente o risco de ocorrência de enfermidades de veiculação hídrica.

Assim, verifica-se que é importante realizar e manter programas com ações que visem instruir os agricultores para que façam a recuperação e proteção dos poços e fontes, a fim de evitar que a água desses mananciais contribua para a transmissão de doenças de veiculação hídrica e, assim, melhorar a qualidade de vida das famílias, por meio da preservação dos recursos hídricos na zona rural.

## REFERÊNCIAS

1. Bordalo AD, Bordalo JS. The quest for safe drinking water: An example from Guinea-Bissau (West Africa). *Water Res*. 2007;41(13):2978-86.
2. Pedley S, Howard G. The public health implication of microbiological contamination of groundwater. *Quart J Eng Geol Hydrogeol*. 1997;30(2):179-88.
3. Suthar S, Chhimpia V, Singh S. Bacterial contamination in drinking water: a case study in rural áreas of northern Rajasthan, India. *Environ Monit Assess*. 2009;159(1-4):43-50.
4. Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicol*. 2004;198(1-3):229-38.
5. Howard G, Pedley S, Barret M, Nalubega M, Johal K. Risk factors contributing to microbiological contamination of shallow groundwater in kampala, Uganda. *Water Res*. 2003;37(14):3421-9.
6. Conboy MJ, Goss MJ. Natural protection of groundwater against bacteria of fecal origin. *J Cont Hidrol*. 2000;43(1):1-24.
7. Amaral LA, Filho AN, Junior ODR, Ferreira FLA, Barros LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saude Publica*. 2003;37(4):510-4.
8. Rossi EM, Fetter KC, Ribeiro DR, Sardiglia CU, Cunha FB. Qualidade bacteriológica das águas subterrâneas de dois municípios do extremo-oeste catarinense. *In: IX Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Curitiba, 2004*.
9. Silva EM, Rossi EM, Scapin D, Sardiglia CU, Cunha FB. Avaliação da qualidade microbiológica da água de poços de propriedades rurais no município de Descanso-SC. *In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. CD de resumos do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007*.
10. Malheiros PS, Schafer DF, Herbert IM, Capuani SM, Silva EM, Sardiglia CU, et al. Contaminação bacteriológica de águas subterrâneas na região oeste de Santa Catarina, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):139-42.
11. Rodhen F, Rossi EM, Scapin D, Cunha FB, Sardiglia CU. Monitoramento microbiológico de águas subterrâneas em cidades do extremo oeste de Santa Catarina. *Ciênc Saúde Colet*. 2009;14(6):2199-203.
12. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, p. 14, 18 de set. 2003. Seção 1.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, p. 266-269, 26 mar 2004, Seção 1.
14. Xavier RP, Siqueira LP, Vital FAC, Rocha FJS, Irmão JJ, Calazans GMT. Microbiological quality of drinking rainwater in the inland region of Pajeú, Pernambuco, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2011;53(3):121-4.
15. Nogueira G, Nakamura CV, Tognim MCB, Filho BAA, Filho BPD. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2003;37(2):232-6.



## Primeiro relato do vírus Orf em rebanhos caprinos do semiárido brasileiro

### First report on the Orf virus infection in goat herds from Brazilian semiarid region

RIALA6/1509

Silvia Ines SARDI<sup>1</sup>, Antonio Lemos Maia NETO<sup>2</sup>, Adajane OLIVEIRA<sup>2</sup>, Roberto AGAPITO<sup>2</sup>, Washington SERAFIM<sup>3</sup>, Marcelo SAMPAIO<sup>2</sup>, Charles MULLER<sup>4</sup>, Juliana Alves TORRES<sup>1,5</sup>, Gubio Soares CAMPOS<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Departamento de Bio-interação, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA). Av Reitor Miguel Calmon, s/n. Vale do Canela, CEP: 40110-100, Salvador, BA, Brasil. Tel: 71 32350937, Fax: 71 32350937. E-mail: sissardi@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Setor Sanidade Animal, Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, BA, Brasil.

<sup>3</sup>Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – SENAR, BA, Brasil.

<sup>4</sup>Escola de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil.

<sup>5</sup>Instituto Federal Sergipe, Campus Gloria, Sergipe, SE, Brasil.

Recebido: 23.02.2012 – Aceito para publicação: 11.08.2012

#### RESUMO

O Ectima contagioso, popularmente conhecido como Boqueira, é uma doença causada pelo vírus Orf, que induz lesões pustulares agudas na pele de ovinos e caprinos. No presente trabalho, é relatada pela primeira vez a identificação e confirmação laboratorial do vírus Orf em rebanhos caprinos da Bahia. A Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) relatou a ocorrência de focos de uma doença epitelial nos caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica nas localidades de Barreira e Pedra Alta, no município de Araci. Foram coletadas as amostras das lesões de crostas labiais do rebanho da localidade de Barreira e das crostas dos tetos do rebanho de Pedra Alta. Os materiais coletados foram submetidos à extração de DNA e posterior reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação dos genes do vírus Orf: ORFV 011 (B2L, 1022 pares de bases [pb]) e ORFV 059 (F1L, 1062 pb). Todas as amostras foram positivas na reação de PCR, confirmando-se a presença do vírus Orf nas lesões observadas nos rebanhos caprinos das comunidades de Barreira e Pedra Alta.

**Palavras-chave.** ectima contagioso, vírus Orf, caprinos.

#### ABSTRACT

The contagious ecthyma is a disease caused by Orf virus, which induces acute skin pustules lesions in sheep and goats. In Brazil the frequency of Orf virus infection seems to be higher than that officially reported. This study is the first report on the Orf virus identification and laboratory confirmation in herds of goats in Bahia. The State Agency of Agriculture Defense of Bahia reported the occurrence of an epithelial disease in goats of Canindé and British Alpine breeds in the Barreira and Pedra alta localities. The lesions were characterized by the occurrence of scabs around the labial fold or being restricted to the udders. The samples from lesions scab were collected from goats labial fold and teats. DNA samples were extracted from these materials, and analyzed by polymerase chain reaction (PCR), and the genes ORFV 011 (B2L, 1022 base pairs [bp]) and ORFV 059 (F1L, 1062 bp) were amplified. All of the samples showed positive PCR reaction, confirming the Orf virus infection in the goat herds of Bahia state.

**Keywords.** contagious ecthyma, Orf virus, goats.

## INTRODUÇÃO

O Ectima contagioso, popularmente conhecido como Boqueira, é uma doença causada pelo vírus Orf, vírus epiteliotrópico, pertencente à família *Poxviridae*, gênero *Parapoxvirus*. Essa virose de distribuição mundial se apresenta com lesões pustulares agudas na pele de ovinos e caprinos, jovens ou adultos, e pode causar infecções cruzadas com outras espécies, inclusive o homem (zoonose)<sup>1</sup>.

Essa doença de tipo vesicular é de alta morbidade e baixa mortalidade (até 1%), embora infecções secundárias possam elevar a mortalidade em até 10% em animais estressados ou imunodeprimidos. Inicialmente, as manifestações clínicas se caracterizam por formação de pápulas, vesículas e pústulas, que passam despercebidas. Depois, formam-se nessas áreas crostas que recobrem a pele. Essas crostas infectadas caem ao secar, e o vírus se mantém viável no meio ambiente durante meses ou anos<sup>2</sup>. As lesões podem ser observadas frequentemente nas comissuras labiais, disseminando-se posteriormente para a região periorbital, perinasal e fossas nasais. Nos casos graves, são observadas também nas gengivas, almofadinha dental, palato, língua e esôfago, ou na região perianal, vulva, cascos e úbere<sup>3</sup>. Essa enfermidade é autolimitante e a maioria dos animais se recupera espontaneamente após um período de uma a quatro semanas, adquirindo imunidade por dois anos. Essa imunidade é efetiva em controlar a replicação viral local, mas não previne a reinfecção<sup>1,2</sup>.

No Brasil, são poucas as referências acerca do Ectima contagioso. Entretanto, a frequência de infecção nos rebanhos parece ser muito mais alta que o reportado oficialmente<sup>4,5</sup>. O fato de ser uma infecção que é comumente tratada com antissépticos (apesar da origem viral), de baixa mortalidade e sem notificação oficial contribui ao desconhecimento da real incidência da enfermidade. Há relatos de surtos em rebanhos de ovinos principalmente no Rio Grande do Sul<sup>6</sup>, São Paulo<sup>7</sup> e em caprinos na Paraíba<sup>8</sup>, Ceará<sup>9</sup> e Pernambuco<sup>10</sup>. No entanto, até o presente momento, não se tem informações de surtos na Bahia, sendo este o primeiro relato de identificação e confirmação laboratorial do vírus Orf em rebanhos de caprinos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Caracterização dos focos

No mês de novembro de 2011, foram notificados pela Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) focos de lesões epiteliais superficiais que

atingiam caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica em comunidades rurais do município de Araci, situado no Território do Sisal, semiárido baiano. Ambos os rebanhos acometidos tinham sido trasladados do município de Jeremoabo para o município de Araci, como parte integrante de um projeto de desenvolvimento da caprinocultura leiteira em sistemas de condomínios. A partir da notificação, foram verificados dois focos nos condomínios de Barreira e Pedra Alta.

### Diagnóstico laboratorial

#### *Coleta e processamento das amostras: extração de DNA*

Foram coletadas amostras de lesões tipo crosta da região da boca e de tetos de quatro animais. As amostras foram retiradas com bisturi, acondicionadas em coletores com solução tampão e enviadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde, da UFBA.

O material obtido foi cortado em pequenos pedaços, colocado em uma solução de Tripsina 0,25% com agitação mecânica à temperatura ambiente e, depois, centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm. O sedimento celular foi submetido a duas lavagens com uma solução salina tampão e logo coletado para extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada com um kit comercial segundo as indicações do fabricante (Qiagen, Co, USA).

#### *Reação em cadeia da polimerase (PCR)*

O DNA extraído foi submetido à reação de PCR seguindo o protocolo descrito previamente<sup>11</sup> para amplificação da sequência completa de dois genes de proteínas altamente imunogênicas do vírus Orf. Foram utilizados os iniciadores, ou *primers*, para sequência completa dos genes ORFV 011 (B2L – fragmento de 1.200 pares de bases [pb]) e ORFV 059 (FLL – fragmento de 1.062 pb). O ciclo de amplificação para ambos casos consistiu em desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos e 60 °C por 45 segundos, seguido de extensão final de 72 °C durante 10 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10 mg/100 mL) e transiluminação com luz ultravioleta.

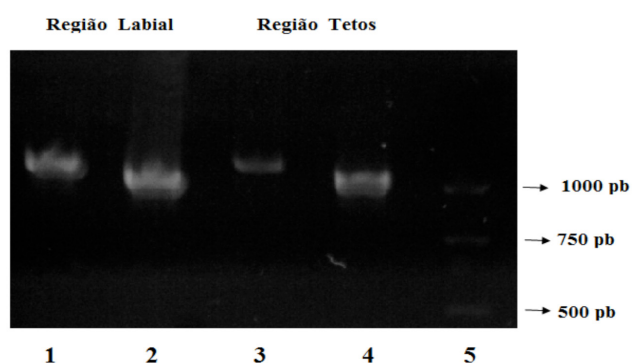
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os focos de Ectima nos caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica foram observados em dois

rebanhos distintos e com lesões em locais anatómicos diferentes. No foco do condomínio de Barreira, as lesões se caracterizavam por crostas labiais em todo o rebanho, enquanto no foco de Pedra Alta as lesões estavam restritas aos tetos das glândulas mamárias das cabras e em quase todo o rebanho (Figura 1). As amostras coletadas da zona dos lábios e tetos foram processadas e resultaram positivas para a amplificação de genes ORFV 011 (BL2) e ORFV 059 (F1L), com bandas de peso molecular de 1.200 pb e de 1.062 pb, respectivamente (Figura 2).



**Figura 1.** Lesão na região bucal causada pelo vírus Orf em cabra da raça Canindé e posterior tratamento com antisséptico local



**Figura 2.** Detecção do vírus ORF: PCR. DNA de amostras de crostas provenientes da região labial e região dos tetos com amplificação positiva para ORFV 011 (1200 pb) (linéas 1 e 3) e ORFV 059 (1062pb) (linéas 2 e 4), respectivamente. (5) Marcador de peso molecular de DNA (Promega, DNA 100 pb)

Os caprinos doentes foram tratados com uma solução de iodo e glicerina, e curaram completamente. Entretanto, em rebanhos em confinamento, pode ocorrer uma disseminação da doença, com sérios prejuízos à

produtividade, ou, ocasionalmente, a morte de animais pela dificuldade para se alimentar.

Um aspecto importante a ser considerado é que, no rebanho de origem (município de Jeremoabo), não foi encontrado qualquer sinal indicativo da enfermidade, assim como os animais não tiveram nenhum contato com outros durante a viagem ou nas localidades de destino. Dessa forma, é provável que tenham vindo para o município de Araci portando o vírus Orf na forma subclínica. Sugere-se que a doença se manifesta em situações indicativas de baixa imunidade por diversas causas, dentre as quais se destacam o confinamento e o estresse do transporte de longas distâncias. Esses animais foram trasladados do município de Jeremoabo para o município de Araci, passando por um intenso processo de estresse, desde a viagem até o momento de serem distribuídos às comunidades de Barreira e Pedra Alta. Além disso, os animais eram criados anteriormente em regime extensivo e passaram rapidamente a ser submetidos a uma criação em confinamento – justamente dois fatores importantes predisponentes ao surgimento da doença: estresse e confinamento.

Concluindo, este estudo confirma pela primeira vez que o vírus Orf circula nos rebanhos caprinos da Bahia e que situações de manejo, condições sanitárias ou viagens prolongadas podem ser fatores predisponentes para adquirir a infecção ou reinfeção viral.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Estado da Bahia (Fapesb), pelo apoio financeiro, e à toda equipe técnica da ADAB, pela sua colaboração em campo.

## REFERÊNCIAS

1. Moss B. Poxviridae: The viruses and their replication. *In: Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer/ Lippincott Williams; 2007. p.2905-46.
2. Hosasami M, Scagliarini A, Bhanuprakash V, McInnes CJ, Singh RK. Orf: an update on current research and future perspectives. *Exper Rev Anti Infect Ther*. 2009;7(7):879-93.
3. Abu EM, Housawi FM. Drastic cutaneous multi-focal orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Rev Sci Tech*. 2009;28(3):1020-9.
4. Mazur C, Ferreira II, Rangel Filho FB, Galler R. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet Microb*. 2000;73:253-9.
5. Abrahão J, Campos R, Trindade G, Guedes M, Lobato Z, Mazur C, et al. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil: a case report. *Virology*. 2009;6:47-51.
6. Salles MW, Barros C, Lemos R, Weiblen R. Ectima contagioso (dermatite pustular) dos ovinos. *Ciênc Rural*. 1992;22(3):319-24.

7. Langoni H, Coelho K, Pimentel M, Siqueira E, Spago E. Ectima contagioso em ovinos na região de Botucatu. *Hora Vet*. 1995;14:60-2.
8. Nobrega JR, Macedo JTSA, Araújo JAS, Dantas AFM, Soares MP, Riet-Correa F. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semiárido de Paraíba. *Pesq Vet Bras*. 2008;28(1):135-9.
9. Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FS, Haddad J. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52:534-43.
10. Torres S. Dermatite pustular contagiosa nos caprinos e ovinos no Pernambuco. *Bol Soc Bras Med Vet*. 1939;9:107-8.
11. Zhao KM, Song D, He W, Zhang B, Li C, Chen K, et al. Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from a an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Vet Microbiol*. 2010;142(3-4):408-15.

## Perfil dos medicamentos manipulados pelas farmácias comunitárias com Autorização Especial

### Profile of medicines prepared by the community pharmacies with Special Authorization

RIALA6/1510

Francisco Eduardo de PONTES<sup>1\*</sup>, Helena Pereira da Silva ZAMITH<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Gerência da Garantia da Qualidade, Instituto Vital Brazil (IVB). Rua Maestro José Botelho, 64, Vital Brazil, CEP: 24230-410, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: pontes07@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Recebido: 23.02.2012- Aceito para publicação: 26.07.2012

#### RESUMO

Nos últimos dez anos, a ocorrência de doenças e de agravos à saúde, e mesmo óbitos, em pacientes que fizeram uso de medicamentos manipulados reacendeu o debate sobre a qualidade desse tipo de medicamento no Brasil. O presente estudo efetuou a descrição do perfil dos medicamentos alopáticos manipulados pelas farmácias comunitárias existentes na época do estudo, com Autorização Especial concedida pela Anvisa (Portaria SVS/MS nº 344/98), e localizadas no município de Nova Friburgo (RJ). Esta investigação foi realizada por meio de pesquisa documental das características consideradas relevantes para o estudo. Foram avaliados os registros do mês de novembro de 2006 dos livros de receituário das farmácias autorizadas a manipular substâncias sujeitas a controle especial, totalizando-se 12.253 fórmulas. Foram verificadas baixa frequência de medicamentos manipulados considerados farmacopeicos (< 1,0%) e alta frequência da forma farmacêutica em cápsula (83%); e que a manipulação destas como monodroga estava concentrada em 15 fármacos, representando classes terapêuticas de grande importância clínica, tais como: antidepressivo, anorexígeno, antipsicótico e anti-hipertensivo. O perfil dos medicamentos manipulados avaliados poderia representar, em termos de saúde pública, potencial risco sanitário quanto à segurança e à eficácia.

**Palavras-chave.** farmácia comunitária, autorização especial, medicamento manipulado, Nova Friburgo.

#### ABSTRACT

In the last ten years, the occurrence of diseases and health injuries, including deaths, in patients who had taken medicines prepared in community pharmacies have brought back into notice the quality of medicines in Brazil. This work analyzed the profile of the allopathic medicines prepared by the community pharmacies, existing at those time and located in Nova Friburgo city, Rio de Janeiro, by the Special Authorization granted by the National Health Surveillance Agency – Anvisa (Regulation SVS/MS no. 344/98). This investigation was performed by means of a documental research on the characteristics considered as relevant to the study. For this purpose, the data recorded in November of 2006 were evaluated, extracted from the Prescriptions Books of the pharmacies which had been licensed to prepare the controlled substances. A total of 12,253 formulas were assessed; a low prevalence of official formulas (< 1%) and a high prevalence of medicines in capsules type (83%) were found. The capsules formulations were composed by only one active component, and they were converged on 15 substances, for preparing antidepressant, anorexigenic, antipsychotic and antihypertensive drugs. From the public health aspect, the assessed medicines profile might represent a potential sanitary risk for their safety and efficacy.

**Keywords.** community pharmacy, special authorization, pharmaceutical compounding, Nova Friburgo.

## INTRODUÇÃO

Os casos de agravos à saúde ocorridos ao longo dos últimos dez anos, envolvendo pacientes que fizeram uso de medicamentos manipulados, despertaram atenção sobre a qualidade desse tipo de medicamento no Brasil<sup>1</sup>.

Yano e Auricchio<sup>2</sup> relataram caso de superdosagem com digitoxina, onde demonstraram que os resultados analíticos correspondiam a 565% do teor declarado no rótulo do medicamento. Yano et al.<sup>3</sup> descreveram superdosagem de colchicina, onde a concentração era vinte vezes maior que a dose máxima recomendada.

Estudos que busquem desvendar características importantes desse tipo de medicamento na realidade brasileira são escassos na literatura científica. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi descrever e avaliar o perfil dos medicamentos manipulados pelas farmácias comunitárias, no que se refere à frequência de características consideradas relevantes na avaliação dos potenciais riscos sanitários desse tipo de medicamento, em termos de segurança e eficácia: medicamentos farmacopeicos, formas farmacêuticas e fármacos manipulados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado censo das quatro farmácias comunitárias localizadas no município de Nova Friburgo, no estado do Rio de Janeiro, devido a este apresentar o maior número de farmácias autorizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a manipular fármacos controlados pela Portaria SVS/MS nº 344/98<sup>4</sup> (Autorização Especial – AE), do universo de municípios sob a competência de fiscalização da Superintendência de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado de Saúde (SUVISA/SES), caracterizando o presente estudo como uma pesquisa documental descritiva.

As farmácias foram codificadas como Farmácias A, B, C e D.

O Livro de Receituário (LR) das farmácias, documento oficial cuja abertura, registros de manipulação e encerramento possuem caráter compulsórios, foi utilizado como fonte de dados. O período definido para o estudo foi o mês de novembro de 2006, uma vez que os dados encontravam-se recentemente arquivados e representariam o perfil dos medicamentos manipulados antes da vigência da Resolução RDC nº 214/2006<sup>5</sup>, que atualizara as Boas Práticas de Manipulação em âmbito nacional.

Para a coleta e consolidação dos dados, foi elaborada uma Planilha Eletrônica Padronizada utilizando o programa Microsoft Excel 2002, mediante modificações de planilha elaborada por Carneiro et al<sup>6</sup>. A planilha foi construída com os seguintes campos: a) código da farmácia; b) número do LR; c) fármaco e dose; d) forma farmacêutica; e) medicamento farmacopeico; f) fármaco controlado; g) medicamento como monodroga; e h) especialidade farmacêutica. O campo h), o qual se referia à existência ou não de especialidade farmacêutica no mercado brasileiro na mesma dose que o medicamento manipulado, não fez parte das análises para elaboração do presente estudo.

Após lançamento na planilha eletrônica e análise dos dados, os resultados foram expressos em números absolutos e percentuais, organizados na forma de tabelas.

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), por meio do Parecer Consubstanciado nº 034/2009 (Protocolo 0041.0.009.000-09). A autorização para utilização dos dados para fins de pesquisa foi concedida pela SUVISA/SES, por meio de declaração assinada e datada em 18 de junho de 2008.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de fórmulas avaliadas no período do estudo foi de 12.253, com a seguinte distribuição: A) 16%; B) 21%; C) 14%; e D) 49%.

### Medicamento farmacopeico

Medicamento farmacopeico foi considerado todo aquele cuja monografia constasse do Formulário Nacional<sup>7</sup>, apresentando, assim, considerável grau de segurança e eficácia – e, conseqüentemente, menor risco sanitário.

Não foram identificados na literatura científica trabalhos que tenham investigado a frequência de medicamentos farmacopeicos. A frequência nas quatro farmácias foi de: a) 0,8%; b) 0,4%; c) 0,2%; e d) 0,1%.

Os medicamentos não farmacopeicos (magistrais) pelas características comuns a qualquer produto personalizado necessitam de informações detalhadas de estabilidade, e não podem ser objeto de análises de controle de qualidade destrutivas, tais como: identificação, teor, uniformidade de doses unitárias e dissolução. Sendo assim, a alta frequência de medicamentos não farmacopeicos representaria maior risco sanitário, em termos de segurança e eficácia.

### Forma farmacêutica

A forma farmacêutica cápsula apresentou alta frequência em todas as farmácias, como demonstrado na Tabela 1.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com trabalhos publicados na literatura nacional. Carneiro et al.<sup>6</sup> detectaram frequência de 81,6% de cápsulas.

Na literatura internacional, os resultados demonstraram perfil diametralmente oposto. Buurma et al.<sup>8</sup> identificaram que as cápsulas somadas aos pós representaram menos de 10%.

Os casos de agravos à saúde, incluindo óbito, ocorridos ao longo da última década no Brasil com medicamentos manipulados não estéreis envolveram formas farmacêuticas de uso oral, em particular cápsulas contendo substâncias de baixo índice terapêutico<sup>2,3</sup>.

A cápsula, forma farmacêutica sólida de uso oral, apresenta em sua manipulação uma série de

pontos críticos. A pesagem, a homogeneização e o encapsulamento são operações fundamentais que influenciam diretamente a qualidade do produto. As etapas de pesagem e encapsulamento podem ser verificadas de forma satisfatória ao longo do processo de manipulação de cada fórmula. Entretanto, a etapa de homogeneização não pode ser verificada de forma simples. Somente ensaios laboratoriais destrutivos e muitas vezes complexos (Uniformidade de Doses Unitárias – Método de Uniformidade de Conteúdo) podem medir a exatidão e a precisão dessa operação<sup>5</sup>.

Baracat et al.<sup>9</sup> identificaram que, apesar dos medicamentos manipulados apresentarem resultados satisfatórios para o teste de determinação de peso (ensaio não destrutivo), houve altas taxas de reprovação no teste de uniformidade de conteúdo (ensaio destrutivo).

A alta frequência da forma farmacêutica cápsula, identificada no presente estudo, representaria maior

**Tabela 1.** Frequência das formas farmacêuticas manipuladas pelas Farmácias A, B, C e D – Nova Friburgo, novembro de 2006

Farmácia	Total manipulado	Cápsula	Loção	Creme	Outros
A	1.966	1.509 (77%)	159 (8%)	95 (5%)	203 (10%)
B	2.538	2.089 (82%)	123 (5%)	107 (4%)	219 (9%)
C	1.706	1.425 (84%)	58 (3%)	72 (4%)	151 (9%)
D	6.043	5.221 (86,4%)	244 (4%)	184 (3%)	394 (6,5%)
Total	12.253	10.244 (83%)	584 (5%)	458 (4%)	967 (8%)

**Tabela 2.** Frequência dos fármacos mais manipulados como cápsula/monodroga pelas Farmácias A, B, C e D – Nova Friburgo, novembro de 2006

Fármaco	Farmácia A <sup>3</sup>	Farmácia B <sup>3</sup>	Farmácia C <sup>3</sup>	Farmácia D <sup>3</sup>	Total <sup>3</sup>
Fluoxetina <sup>1</sup>	10,8%	6,0%	6,7%	17,0%	12,4%
Omeprazol	11,1%	15,8%	11,1%	9,6%	11,3%
Sinvastatina	9,0%	9,2%	11,4%	4,6%	7,1%
Femproporex <sup>1</sup>	1,1%	1,8%	1,1%	6,2%	3,8%
Anfepramona <sup>1</sup>	1,0%	0,7%	1,5%	6,2%	3,6%
Sertralina <sup>1</sup>	1,4%	1,7%	1,8%	3,6%	2,6%
Alendronato de sódio	3,9%	2,6%	2,8%	1,9%	2,4%
Losartan <sup>2</sup>	2,4%	4,1%	2,9%	1,4%	2,3%
Anlodipino <sup>2</sup>	2,4%	2,7%	4,6%	1,4%	2,2%
Enalapril <sup>2</sup>	2,4%	3,6%	2,3%	1,3%	2,1%
Paroxetina <sup>1</sup>	2,1%	0,9%	1,0%	2,7%	2,0%
Ginkgo biloba	3,6%	1,8%	2,5%	1,3%	1,9%
Risperidona <sup>1</sup>	0,9%	0,5%	1,2%	2,1%	1,4%
Atenolol <sup>2</sup>	1,1%	1,9%	2,2%	0,9%	1,3%
Lisinopril <sup>2</sup>	2,2%	1,3%	2,5%	0,7%	1,3%
Total	55,7%	54,5%	55,8%	60,9%	58,0%
Total Monodroga	1.237	1.647	970	3.915	7.769

<sup>1</sup> Fármaco constante da Portaria SVS/MS nº 344/98

<sup>2</sup> Fármaco utilizado no tratamento da hipertensão

<sup>3</sup> Percentual calculado em relação ao total de monodroga

risco sanitário em termos de segurança e eficácia, principalmente se confrontados com os dados da literatura internacional.

### **Fármacos manipulados como cápsula/monodroga**

Devido à alta frequência da forma farmacêutica cápsula e sua importância em termos de risco sanitário, decidiu-se investigar quais seriam os fármacos mais manipulados nessa forma farmacêutica. Foram identificados 214 fármacos manipulados como cápsula/monodroga. Na Tabela 2, verificamos que os 15 mais manipulados como cápsula/monodroga são responsáveis, em todas as farmácias, por mais de 50% dos medicamentos manipulados como monodroga.

É relevante atentarmos para o fato de que, dentre os 15 fármacos da Tabela 2, seis constam da Portaria SVS/MS nº 344/98 – como os antidepressivos (fluoxetina, sertralina e paroxetina), os anorexígenos (femproporex e anfepramona) e o antipsicótico (risperidona) – e cinco são utilizados para o tratamento da hipertensão (losartan, anlodipino, enalapril, atenolol e lisinopril).

Nossos resultados estão de acordo com Andrade et al.<sup>10</sup>, que detectaram que o femproporex e a anfepramona foram os fármacos constantes das listas B da Portaria SVS/MS nº 344/98 mais prescritos e que, da lista C1, a fluoxetina foi o fármaco mais frequente.

Os dados na literatura internacional são escassos. Todavia, podemos citar Buurma et al.<sup>8</sup>, que constataram que os fármacos mais frequentes eram os de uso em dermatologia (57%), contrastando com os nossos resultados.

No caso particular do nosso estudo, soma-se ao maior risco inerente à utilização de formas farmacêuticas de uso oral (cápsula), comparado às formas farmacêuticas de uso tópico, a manipulação de medicamentos contendo fármacos de classes terapêuticas com ação farmacológica de grande importância clínica, representando maior risco sanitário.

### **CONCLUSÃO**

O presente estudo nos permite concluir que os medicamentos alopáticos não estéreis manipulados pelas farmácias com Autorização Especial no município de Nova Friburgo apresentam como principais características: baixa frequência de medicamentos

farmacopeicos, alta frequência da forma farmacêutica cápsula e concentração em poucos fármacos de grande importância clínica.

O perfil dos medicamentos manipulados descrito no presente estudo representaria importante risco sanitário em termos de segurança e eficácia.

A abordagem adotada no estudo poderia servir como guia para pesquisas em âmbitos mais amplos (estadual ou nacional), que pudesse contribuir no planejamento de ações do poder público que visassem diminuir os riscos à saúde pública relacionados ao uso dos medicamentos manipulados no Brasil.

### **REFERÊNCIAS**

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Subsídios à discussão sobre a proposta de regulamentação para farmácias magistrais. *Rev Saúde Pública*. 2005;39:691-4.
2. Yano HM, Auricchio MT. Digitoxina: superdosagem em medicamento manipulado. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64:273-5.
3. Yano HM, Bugno A, Auricchio MT. Intoxicação por colchicina em formulação manipulada. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67:234-6.
4. Brasil. Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998, da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre Substâncias e Medicamentos Sujeitos a Controle Especial. [acesso 2012 dez 2]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344\_98.htm].
5. Brasil. Resolução RDC nº 214 de 2006, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em Farmácias. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 18 dez 2006, Seção 1, p. 1-33, Suplemento nº 241.
6. Carneiro MFG, Guerra Júnior AA, Acúrcio FA. Prescrição, dispensação e regulação do consumo de psicotrópicos anorexígenos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24:1763-72.
7. Brasil. Resolução RDC nº 222, de 2 de agosto de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova a 1ª Edição do Formulário Nacional. [acesso 2012 dez 2]. Disponível em: [http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/FN\_2005\_RDC222.pdf].
8. Buurma H, Smet PAGM, Hoff OP, Sysling H, Storimans M, Egberts ACG. Frequency, nature and determinants of pharmacy compounded medicines in Dutch community pharmacies. *Pharm World Sci*. 2003;25:280-7.
9. Baracat MM, Montanher CLS, Kubacki AC, Martinez RM, Zonta GAN, Duarte JC, et al. Avaliação da qualidade de formulações manipuladas e industrializadas de sinvastatina. *Lat Am J Pharm*. 2009;28:427-32.
10. Andrade MF, Andrade RCG, Santos V. Prescrição de psicotrópicos: avaliação das informações contidas em receitas e notificações. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2004;4:471-9.



## Opsonization and transformation: effects of anticapsular sera on the DNA transfer in *Neisseria meningitidis*

### Opsonização e transformação: efeitos do soro anticapsular sobre a transferência de DNA em *Neisseria meningitidis*

RIALA6/1511

Gisele Cristiane Gentile CURY, Rafaella Fabiana Carneiro PEREIRA, Luciana Maria de HOLLANDA, Marcelo LANCELOTTI\*

\*Corresponding Address: Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, CP6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55 19 3521 6150, Fax: +55 19 3521 61 29, e-mail: mlancell@unicamp.br  
Recebido: 30.08.2011 – Aceito para publicação: 30.09.2012

#### RESUMO

O processo de comutação capsular indica a ação de anticorpos capsulares específicos na adaptação de linhagens de meningococo. Foram empregados diferentes anticorpos para verificar o efeito da opsonização sobre a transformação de *Neisseria meningitidis* dos sorogrupos C e W135. Essas análises mostraram o bloqueio da transformação pela ação de anticorpos capsulares específicos ao meningococo, demonstrando assim o efeito bloqueador da ação desses componentes sobre o processo de transformação de *N. meningitidis*. Tal efeito pode estar ligado com o processo de comutação capsular e abre novos campos para exploração científica.

**Palavras-chave.** *Neisseria meningitidis*, transformação, opsonização, cápsula.

#### ABSTRACT

The capsular switching process indicates the action of specific capsular antibodies on the meningococcal strains adaptation. Different antibodies were employed for assessing the effect of opsonization on the transformation of *Neisseria meningitidis* serogroups C and W135. These analyses showed the blocking action of the specific capsular antibodies on the meningococcal transformation capacity. Thus, the blocking effect of these antibodies on *N. meningitidis* transformation process was demonstrated. This effect could be involved in the capsular switching process and the found data might open new subjects for scientific exploration.

**Keywords.** *Neisseria meningitidis*, transformation, opsonization, capsule.

## INTRODUCTION

*Neisseria meningitidis* or meningococci (Mc) is a Gram negative bacterium that may cause meningitis and septicemia outbreaks in several regions of the world. As *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, these natural competent bacteria for transformation by DNA, colonize the upper respiratory tractus in human. Outer membrane proteins are involved in DNA uptake<sup>1</sup>. These proteins recognize and transfer to cytoplasm DNA fragments containing specific uptake sequences (US). In *H.influenzae* the US is composed of 9bp (5'AAGTGCGGT3') while in *Neisseria* the US is composed of 10bp first recognized in *N.gonorrhoeae* (5'GCCGTCTGAA3'). Furthermore, outer membranes vesicles (bleb's) are also described as carrier of DNA in *Neisseria*<sup>2</sup>.

Transformation was involved in capsule switching in *N. meningitidis*. Capsular switching events are expected to occur continuously and can be selected by immune response against a particular capsular polysaccharide<sup>3,4</sup>. However, the interference of immune response with transformation efficacy has not yet evaluated. Specific capsular antibodies are expected to bind to the bacterial surface and hence the interference in DNA recognition and uptake. In this work we aimed to explore the action of the opsonization process on DNA transformation in *N. meningitidis*, using different serogroup specific antibodies.

The strains C2135 its derived KZ1 (serogroup C strain harbouring *pilC1:lacZ:aphA3'*) and W135atcc and its derived W03.01. Bacteria were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> on chocolate agar. When needed, kanamycin or erythromycin were added to the medium at 100 µg/mL and 2 µg/mL, respectively. The disrupted *synG* mutant was designed for inactivated *synG* gene responsible for the synthesis of the W135 capsular polysaccharide<sup>5</sup>.

Reciprocal transformations assays of these two strains were performed in triplicate assays. Bacteria were first incubated with a rabbit serum directed against serogroup C or serogroup W135 capsule. After incubation for 1h at 37 °C, 100 µL of the opsonized bacterial suspension was mixed with 5 µg of genome DNA from KZ1 or W03.01 strains. After 5 hours of incubation at 37 °C 5% CO<sub>2</sub>, transformants were selected on chocolate plates supplemented with appropriate antibiotics. All assays were performed without any

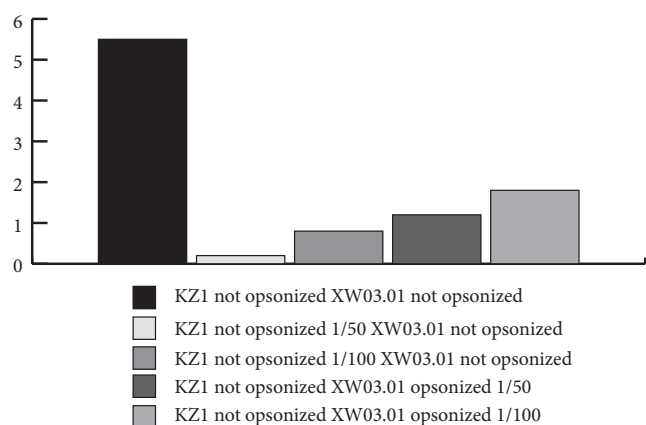
source of complement. All antibodies did not show any bactericidal effects under these experimental conditions.

Genomic DNA from strain KZ1 was used to transform the strain C2135. The frequency transformation dropped from  $2.5 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-7}$  and  $5 \times 10^{-8}$  after opsonization with anti-capsular antibodies. No such a reduction was observed when transformation was performed in the presence of anti-pilin antibodies. Both types of antibodies similarly recognized the strain C2135 (data not shown). Similar results were obtained when the strain W135atcc was transformed by DNA from strain W03.01 in the presence or absence of anti capsular W135 antibodies (data not showed).

We next tested the effect of anti-capsule serum on the transformation in a co-culture experiment with KZ1 and W03.01 strains at equivalent concentrations of  $1.10^8$  CFU/mL in BHI broth. We scored the transformants exhibiting resistance to both kanamycin and erythromycin in presence of serogroup C or W135 anti-capsule sera at 1/50 and 1/100 dilutions. Our results showed a drastic reduction in the frequency of transformation in the presence of either of these sera when compared to transformation experiment in the absence of sera (Figure 1). Also, our data indicate the presence of the capsule does not inhibit the transformation and the opsonization process was able to inhibit the transformation. Indeed, the mechanisms of DNA uptake in *Neisseria* genus are known in *N. gonorrhoeae*, a non-capsulated bacteria whereas many proteins had been identified as responsible for the uptake system<sup>1</sup>. The role of capsule specific antibodies may be relevant after vaccination to limit DNA transfer in strains tagged by the vaccination.

**Table 1.** Strains of *Neisseria meningitidis* used in this work

Strain	Description	Reference
C2135	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C, BIOMERIEUX is derived from KZ1	INCQS - FIOCRUZ
KZ1	Derived from LNP8013 clone 12 <i>pilC1:lacZ:aph3'</i> transcriptional fusion	Taha et al. <sup>6</sup>
W135 atcc	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup W135, ATCC35559	INCQS - FIOCRUZ
W03.01	Derived from W135 atcc containing the <i>ermAM</i> cassette into <i>BclI</i> site of <i>synG</i>	This work



**Figure 1.** Transformation Frequency after co-culture assays between KZ1 and W03.01. This histogram show the differences into transformation frequency submitted to opsonization process of the meningococcal strains. The strains were opsonized with rabbit antibodies specific to the serotype C and W135 capsular polysaccharide.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks for Dr. Taha and Dr. Alonso from Pasteur Institut for gift the rabbit antisera. The LABIOTEC was supported by FAPESP (number 2008/56777-5) and CNPq (number 575313/2008-0). LMH received grants to CAPES funding by Nanobiotechnology Program.

## REFERENCES

1. Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *An Rev Microbiol*. 1999;53:217-44.
2. Tortosa P, Dubnau D. Competence for transformation: a matter of taste. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(6):588-92.
3. Perez-Trallero E, Vicente D, Montes M, Cisterna R. Positive effect of meningococcal C vaccination on serogroup replacement in *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 2002;21;360(9337):953.
4. Taha MK, Parent Du Chatelet I, Schlumberger M, Sanou I, Djibo S, de Chabaliere F, et al. *Neisseria meningitidis* serogroups W135 and A were equally prevalent among meningitis cases occurring at the end of the 2001 epidemics in Burkina Faso and Niger. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1083-4.
5. Hollanda LM, Cury GC, Pereira RF, Ferreira GA, Sousa A, Sousa EM, et al. Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnol*. 2011;9:28.

## Bifenilos policlorados (PCBs) em milho e farinha de milho do estado do Rio Grande do Sul

---

Schwanz, TG. **Polychlorinated biphenyls (PCBs) in corn and cornflour from Rio Grande do Sul state**. 2011. Santa Maria, RS. [Dissertação de Mestrado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber. Co-orientador: Nilo Zanatta.

---

Devido a alta toxicidade, a produção e comercialização dos bifenilos policlorados (PCBs) estão proibidas em todo mundo. Esses compostos aromáticos foram utilizados industrialmente desde a década de 1930. Propriedades físicas interessantes, como resistência a altas temperaturas e correntes elétricas, são responsáveis pela grande utilização e produção mundial dos PCBs. Desta produção, grande parcela entrou para o ambiente, principalmente devido ao descarte inadequado de equipamentos eletro-eletrônicos, contaminando água e solo. São compostos não biodegradáveis que se acumulam no ambiente, influenciando os organismos da cadeia alimentar. A partir de estudos realizados, constatou-se seu efeito nocivo no homem, sendo a ingestão através de alimentos contaminados a principal via de exposição. Sabe-se, pela sua importância histórica na sobrevivência humana, que os cereais são essenciais em nossa alimentação. Dentre os cereais, o milho recebe amplo destaque por ser o mais consumido no mundo. Diante disso, aliado com a persistência dos PCBs e seus efeitos maléficos ao homem, o objetivo do presente trabalho foi determinar os níveis de PCBs em milho e farinha de milho de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, coletados nos anos de 2009 e 2010, correlacionando os níveis destes compostos a região de coleta, ano de produção, teor de gordura e tipo de farinha. A determinação dos resíduos de PCBs foi realizada por cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (GC-MS), usando modos de ionização por impacto de elétrons e ionização química negativa, após a extração dos compostos através do uso de ultrassom. Foram encontrados valores médios de 0,01 ng.g<sup>-1</sup> para o PCB 10, 0,04 ng.g<sup>-1</sup> para o PCB 28, 0,10 ng.g<sup>-1</sup> para o PCB 52, 0,14 ng.g<sup>-1</sup> para o PCB 153, 0,40 ng.g<sup>-1</sup> para o PCB 138 e 0,38 ng.g<sup>-1</sup> para o PCB 180. O PCB 138 foi o mais frequente, sendo detectado em 63,57% das amostras, seguido dos PCBs 180 (58,27%), 52 (41,72%), 153 (41,05%), 28 (20,52%) e 10 (7,28%). Amostras provenientes das regiões nordeste e metropolitana foram as que apresentaram as maiores contaminações. Houve ainda uma diminuição das contaminações no ano de 2010 quando comparado ao de 2009. Outro fator relevante foi a maior contaminação encontrada nas farinhas de milho em relação ao grão. Esta diferença se mostrou significativa para os PCBs 52, 138, 153 e 180. Relativamente às análises das farinhas, houve diferença significativa para todos os congêneres na correlação com os percentuais de gordura.

**Palavras-chave.** bifenilos policlorados, milho, farinha de milho, GC-MS.

Dissertação disponível na  
Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
E-mail: tgsnapo@gmail.com

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

### POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aquelles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores. Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org>).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS) – bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9.605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6.638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

### INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

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

### 1. CATEGORIA DE ARTIGOS

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

#### INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (key words).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

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

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

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

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (key words).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

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

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (key words).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

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

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (key words).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

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

**Informações complementares:**

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

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

**2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO:** Deve constar:

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

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

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

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

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

**2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:**

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

**Palavras-chave/key words:** Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH). Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

**Estrutura do texto:**

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

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

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

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

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

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

**Exemplos:** Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06<sup>1</sup>, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>.

Segundo Chang et al<sup>31</sup>, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

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

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

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

### **Exemplos:**

#### **Artigos de periódicos:**

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

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

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

#### **Livros:**

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

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

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

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

#### **Capítulos de livro:**

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



**Dissertações, teses e monografias:**

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

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

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

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

**Dados eletrônicos:**

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

**Legislação:**

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

**Autoria institucional:**

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

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

**Patente:**

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

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

**2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS:** A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

**A) Tabelas:** Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

**B) Figuras:** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

**3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS:** Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

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

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL .

#### 4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

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

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

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

**7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO:** Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

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

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

Assessoria Editorial:

**TIKINET**

[www.tiki.net.br/tiki](http://www.tiki.net.br/tiki)





Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA  
DA SAÚDE

