



Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 72 número 3, 2013
julho - setembro 2013

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

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Editores Assistentes

Neuza Kasumi Shirata Iso
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Christiane Asturiano Ristori Costa
Gisele Letícia Alves
Iracema de Albuquerque Kimura
Jacqueline Tanury Macruz Peresi
Lucile Tiemi Abe Matsumoto
Márcia Liane Buzzo
Raquel dos Anjos Fazioli
Sérgio Dovidauskas
Virginia Bodelão Richini Pereira
Thales de Brito
Lílian Nunes Schiavon
Sylia Rehder

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.
Lúgia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

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

1941
2013, 72(3)

ISSN 0073-9855 CDD₁₈ 614.07205

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

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

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

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

1562 Geoprocessamento em Saúde Pública: fundamentos e aplicações

Use of geo-processing system in Public Health: principles and applications

Susilene Maria Tonelli NARDI, José Antonio Armani PASCHOAL, Heloisa da Silveira Paro PEDRO, Vânia Del' Arco PASCHOAL, Eduvaldo Paulo SICHIERI 185-191

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

1563 Concentração de alfa-tocoferol em colostro humano e em fórmulas infantis e o atendimento ao requerimento nutricional do recém-nascido

Concentration of alpha-tocopherol in human colostrum and infant formulas and the compliance with the newborn nutritional requirement

Larisse Rayanne Miranda de MELO, Heleni Aires CLEMENTE, Roberto DIMENSTEIN..... 192-197

1564 Presença de inibidores de proteases em amostras comerciais de “faseolaminas” utilizadas como bloqueadores de carboidratos e os riscos à saúde.....

Occurrence of proteases inhibitors in commercial samples of “phaseolamins” used as carbohydrate blockers and the health risks

Mariana dos Santos MURRA, Tassia Batista PESSATO, Olga Luisa TAVANO 198-205

1565 Pesquisa de fungos produtores de ocratoxina A em granola comercializada

Ochratoxin A-producing fungi in commercial granola

Marta Rejane Ribeiro dos SANTOS, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO, Vânia Batista de Sousa LIMA, Antônio William Barbosa de SOUSA, Mikaela Lopes de CALDAS, Maria Christina Sanches MURATORI..... 206-210

1566 Determinação de Cd, Cr e Pb no leite e na alimentação bovina do Brasil

Determination of Cd, Cr and Pb in milk and in cattle feed in Brazil

Ana Caroline Schuck GOMES, Cleber Antonio LINDINO, Affonso Celso GONÇALVES Jr, Gilmar Divino GOMES..... 211-218

1567 Contaminação parasitária em alfaces crespas (*Lactuca sativa* var. *crispa*), de cultivos tradicional e hidropônico, comercializadas em feiras livres do Rio de Janeiro (RJ)

Parasitological contamination in lettuces (*Lactuca sativa* var. *crispa*), from traditional and hydroponic cultivations, commercialized in free markets of Rio de Janeiro (RJ)

Bruno Barbosa PACIFICO, Otilio Machado Pereira BASTOS, Claudia Maria Antunes UCHÔA 219-225

1568 Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos por meio de técnica *time kill*

Analysis of *in vitro* antimicrobial activity of antiseptics products by means of time kill assay

Hilda do Nascimento NÓBREGA, Joana Angélica Barbosa FERREIRA, Célia Maria Carvalho Pereira Araújo ROMÃO, Ivano Raffaele Victorio de Filippis CAPASSO..... 226-233

■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

- 1569 Determinação da sensibilidade do teste de ELISA para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de águas brutas**
Sensitivity of ELISA for detecting *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in raw waters samples
Regina Célia Arantes STANCARI 234-238
- 1570 Microbiological quality of finger food and snacks**
Qualidade microbiológica de lanches e salgados
Sarah Hwa In LEE, Carlos Henrique CAMARGO, Elisângela de Souza MIRANDA, Ary FERNANDES JUNIOR, Vera Lúcia Mores RALL..... 239-243
- 1571 Uso de ultrassom associado ou não ao dicloisocianurato de sódio na sanitização de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*)**
Use of ultrasound associated or not with sodium dichloroisocyanurate in the disinfection of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*)
Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ, Hiasmyne Silva de MEDEIROS..... 244-248
- 1572 Teor de carotenoides em nutricosméticos: análise da adequação e qualidade do produto**
Carotenoids content in nutricosmetics products: evaluation of product adequacy and quality
Fernanda Marques PEIXOTO, Renata Galhardo BORGUINI, Allien Monique Rosa MACHADO, Ana Cristina Miranda Senna GÔUVEA, Sidney PACHECO, Ronoel Luiz de Oliveira GODOY 249-254
- INSTRUÇÕES AOS AUTORES 255-260

Geoprocessamento em Saúde Pública: fundamentos e aplicações

Use of geo-processing system in Public Health: principles and applications

RIALA6/1562

Susilene Maria Tonelli NARDI^{1*}, José Antonio Armani PASCHOAL², Heloisa da Silveira Paro PEDRO¹, Vânia Del'Arco PASCHOAL³, Eduvaldo Paulo SICHIERI²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Biomédicas, Instituto Adolfo Lutz. Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325. Tel.: (17) 3224-1423 / (17) 3224-2602 ramal 21, Maceno. CEP: 15060-020, São José do Rio Preto, SP. E-mail: snardi@ial.sp.gov.br

²Departamento de Arquitetura e Urbanismo, Universidade de São Paulo, São Carlos.

³Departamento de Enfermagem em Saúde Coletiva e Orientação Profissional, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, FAMERP.

Esta pesquisa teve o apoio financeiro do CNPq- Edital MCT-CNPq/ MS-SCTIE-DECIT no. 35/2005.

Recebido: 29.11.2012 - Aceito para publicação: 29.08.2013

RESUMO

Neste trabalho foi averiguado o uso do geoprocessamento como ferramenta para realizar pesquisa e como subsídio para efetuar planejamento de ações em saúde pública. Diversos investigadores têm citado a construção de sistema de vigilância da saúde orientado por um modelo de análise de situações de risco, em substituição ao modelo de risco individual. Esta alternativa, que utiliza o espaço como referência, tem potencialmente mostrado maior poder explicativo por expressar diferentes acessos aos bens e aos serviços de infraestrutura urbana. Com o sistema de geoprocessamento, torna-se possível observar os fatores socioeconômicos, assim como a utilização e as formas de ocupação de áreas. Além disso, podem ser obtidos dados relevantes para efetuar o controle da vigilância em relação à saúde e ao meio ambiente construído e habitado. O uso do geoprocessamento constitui uma importante ferramenta para realizar a identificação, a localização e o acompanhamento de populações, principalmente nas periferias dos grandes centros urbanos. Este sistema contribui, ainda, para desenvolver os estudos de transmissão, de disseminação e, ainda, das ações de controle das doenças e dos agravos de saúde de uma determinada área de abrangência.

Palavras-chave. saúde pública, distribuição espacial da população, vigilância epidemiológica, epidemiologia, geoprocessamento em saúde.

ABSTRACT

In the present study is described the importance of the geographic information system (GIS) as a tool for performing research and as a subsidy for action planning in public health. Many investigators have described the construction of a health surveillance system based on a model to analyze the risk situations, aiming at replacing the individual risk model. This option employs the space as a reference, which potentially holds greater explanatory power for expressing different approaches to the profits and services for urban infrastructure. The geo-processing allows to observe the socioeconomic factors, the ways and the use of occupying the inhabited areas, to acquire relevant data for monitoring the sanitary surveillance, and also built and inhabited environment. The geo-processing works as an important tool for performing the identification, location and follow-up of populations. Therefore, the geo-processing contributes to the study on transmission, distribution and actions directed to the diseases and health problems control in a given scope area.

Keywords. public health, residence characteristics, epidemiologic surveillance, epidemiology, health geo-processing.

INTRODUÇÃO

O geoprocessamento é definido como um conjunto de tecnologias de coleta de dados¹ que produz informação demográfica e contribui para o reconhecimento das condições de risco no território². Transformou-se em um instrumento válido para auxiliar na construção de mapas e ajudar no planejamento, monitoramento e na avaliação das ações em saúde³.

Neste sentido, o interesse das secretarias de saúde no uso do geoprocessamento e de outros *softwares* para esquadrinhamento da área urbana tem sido notável^{4,5}, uma vez que, além de transcender o monitoramento de indivíduos doentes, estabelecendo uma lógica para intervenções que sejam diferenciadas e seletivas, enquadra-se nas diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS).

Qualquer mapa que simule representação diferente da mera reprodução do terreno pode ser classificado como temático⁶. Esse tipo de mapa é extremamente eficaz, pois pode mostrar a realidade, facilitar a realização de pesquisas, além de auxiliar no planejamento e controle tanto de áreas legalizadas como clandestinas. Esse recurso tem sido utilizado por vários autores na área da saúde, desde a descrição de endemias, no século passado, até a análise da possibilidade de vulnerabilidade social da gravidez em adolescentes⁷⁻⁹, e seus resultados têm contribuído para a detecção de pontos de transmissão e para a redefinição da distribuição da rede de assistência de saúde dentro de um dado município. Neste estudo, objetiva-se descrever o uso do geoprocessamento como ferramenta e subsídio para o planejamento de ações em saúde pública, e destacar, por meio de revisão bibliográfica, sua aplicação e contribuição em pesquisas científicas.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo no qual foram realizadas a busca e a análise crítica de artigos científicos da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), nas bases de dados Medline, SciELO, Biblioteca Cochrane, LILACS, IBECs, coletados em 2012, que utilizaram o geoprocessamento no estudo de doenças de saúde pública.

Inicialmente, foram selecionados os artigos para a construção de uma breve história sobre a condução dos estudos da área de saúde, seguida de uma descrição sobre

a utilização da tecnologia de georreferenciamento e de uma análise dessa tecnologia associada à saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Breve histórico da condução de estudos na área da Saúde

A partir do século XVI, as características geográficas, principalmente o clima, eram colocadas como responsáveis pela ocorrência das doenças infecciosas e parasitárias¹⁰. Nos séculos seguintes, embasada na clínica e na estatística, nasce a epidemiologia para explicar a ocorrência das doenças transmissíveis, tendo como foco a ocorrência da doença nas coletividades¹¹. Já no início do século XX, foram valorizados os estudos sobre o impacto do ambiente, especialmente o clima, nas condições de saúde do homem¹². Nesse sentido, as ideias de Pavlovsky pressupunham a interação homem-ambiente, em que o desequilíbrio pudesse produzir, alterar ou transformar os focos de transmissão de doenças¹³.

Nos anos 1960, a diferenciação social e cultural, mais uma vez, volta a ser considerada como determinante da variabilidade espacial da saúde-doença¹², apoiada, principalmente, nos recursos da epidemiologia¹¹.

Ainda na década 1960 e também na década 1970, os fatores econômicos e sociais, tidos como determinantes dos fenômenos coletivos, passam a ser entendidos não apenas como atributos individuais ou elementos do ambiente físico, mas também como fenômenos populacionais que consideram a historicidade de sua determinação. Nesta linha de investigação, podem ser citados os trabalhos de Barreto¹⁴, Silva¹⁵, Paim¹⁶ e Barata et al¹⁷.

A intersectorialidade, nos anos seguintes, também passa a ser considerada nos estudos, pois trata da articulação entre setores sociais, saberes, poderes e vontades, para enfrentar problemas complexos. É uma tendência, cuja finalidade é construir políticas públicas para a superação da fragmentação dos conhecimentos e das estruturas sociais para produzir efeitos mais significativos na saúde da população¹⁸.

Geoprocessamento na área da saúde

O geoprocessamento é uma importante ferramenta para a identificação, localização, o acompanhamento e monitoramento de populações. Essa tecnologia baseia-se na medição de determinada

variável com sua localização. Uma vez processadas (ou georreferenciadas), as informações podem ser expressas em formato de mapas digitais¹⁹. Utiliza-se de simbologias diversas para representar os fenômenos espacialmente distribuídos na superfície (FIGURA 1). Assim, esse tipo de análise permite identificar bolsões de carência e de ocorrência dos agravos em micro áreas de forma simultânea e interativa²⁰.

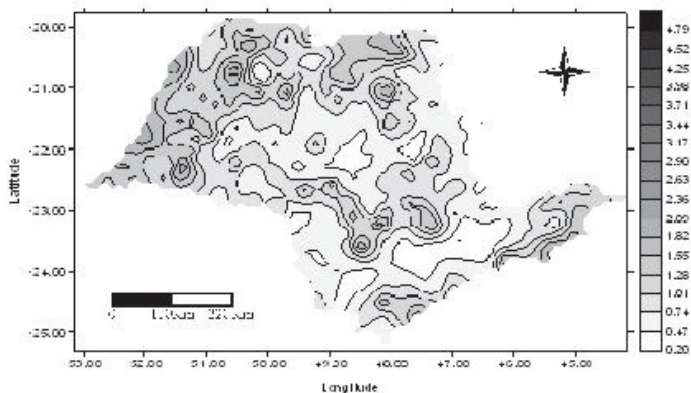


Figura 1. Espacialização das taxas de detecção de hanseníase, no Estado de São Paulo, 1991-2002

Fonte: Opromolla PA, Dalben I, Cardim M. Análise da distribuição espacial da hanseníase no Estado de São Paulo, 1991-2002. Rev Bras Epidemiologia. 2005; 8(4): 356-64

Mapas e dados associados a localizações já são utilizados, no cotidiano, para o planejamento e a gestão de recursos e serviços e para a elaboração de políticas públicas ou privadas²¹. Além disso, a construção de modelos de endemia em áreas urbanas vem sendo analisada por situações de riscos e por indicadores epidemiológicos espaciais, facilitando a monitoração de doenças endêmicas ou evidenciando as desigualdades sociais^{7,22}.

Utilizando os conceitos de Mendes²³ para território-solo, é possível observar a distribuição geopolítica espacial dos casos de determinada doença nos municípios, o que possibilita a localização rápida e a visão das regiões mais atingidas, chegando a determinar as ruas e os números em que as ocorrências localizam-se²⁴ e a ressaltar a ocorrência do tempo como fator de interação com essas circunstâncias.

A Vigilância em Saúde estabelece, dentro de uma lógica assistencial, as áreas de abrangência constituídas por conglomerados e por setores censitários, que correspondem a espaços de responsabilidade de uma unidade de saúde²⁵ com maior poder explicativo para expressar diferentes acessos aos bens e aos serviços de infraestrutura urbana²⁶.

A análise da distribuição espacial dos casos de determinada doença em municípios alicerça estudos sobre a transmissibilidade nas regiões e nas áreas de abrangência, permitindo acesso rápido às informações necessárias para realizar a vigilância dos casos. Da mesma forma, cria condições para avaliar a necessidade da descentralização dos tratamentos, pois mostra onde a população é mais atingida, facilitando o trabalho dos profissionais, a distribuição de medicamentos, as ações de educação permanente e continuada e a realocação dos recursos humanos e físicos (FIGURA 2).

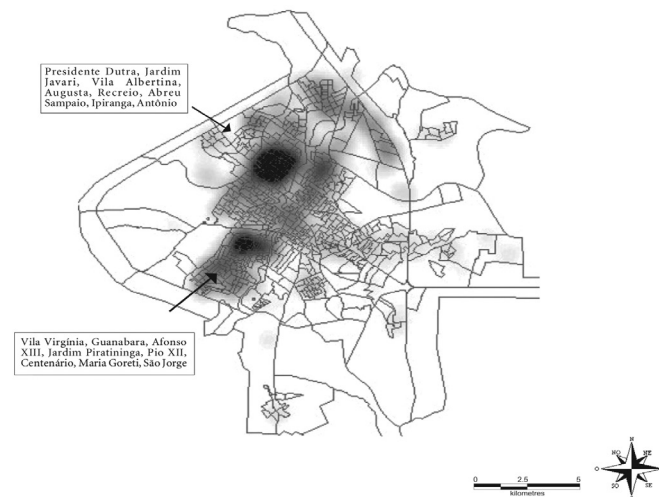


Figura 2. Mapa da distribuição da densidade de casos novos de Tuberculose, obtidos por meio do estimador Kemel, Ribeirão Preto-SP. 2000-2006

Fonte: Hino P, Villa TCS, Cunha TN, Santos CB. Padrões espaciais da tuberculose e sua associação à condição de vida no município de Ribeirão Preto. Ciênc Saúde Coletiva. 2011;16(12):4795-802

Um novo aspecto que tem gerado interesse, não só da área de saúde, são as construções em áreas clandestinas urbanas que ocupam irregularmente as áreas dos lotes, dificultando, assim, a prevenção da transmissão das doenças. Nas últimas décadas, houve o crescimento desordenado do tecido urbano das grandes cidades brasileiras, aliado a um padrão de expansão horizontal contínua, estimulado pela inserção de conjuntos habitacionais populares e pelo surgimento de loteamentos clandestinos nas áreas de expansão.

A preocupação com essas questões justifica-se pelo crescimento intenso das áreas urbanas, nas últimas décadas, lado a lado com a pobreza e a insustentabilidade das cidades brasileiras, muito embora, nos grandes centros, haja projetos diretores aprovados consensualmente pelos legislativos que planejam o crescimento das cidades²⁷.

Dessa forma, essas populações tendem a ser empurradas para lugares sem serviços públicos e com quase nenhuma renda diferencial. São locais onde investimentos em saneamento, principalmente no tratamento de esgoto, diminuiriam a incidência de doenças e de internações hospitalares e evitariam o comprometimento dos recursos hídricos do município.

Em se tratando de ações da área da saúde, a intersetorialidade proposta pelo SUS contempla a avaliação e a inspeção de áreas de abrangência de uma determinada região ou polo e faz a vigilância em saúde junto às habitações. Os agentes comunitários, a vigilância sanitária e as diversas fiscalizações da Prefeitura Municipal inspecionam e preocupam-se com o meio ambiente, além de procurar coibir as ações dos ocupantes dos imóveis irregulares e vizinhos que são destrutivas ou que comprometem a saúde pública.

Outra aplicação do geoprocessamento são os aglomerados (*clusters*), que podem ser entendidos como um conjunto de pessoas ou de atividades que se concentram em espaços físicos relativamente pequenos^{28,29}, facilitando o entendimento e a análise das circunstâncias que envolvem os problemas focalizados.

Aplicação do Geoprocessamento na Saúde

Estudos estão sendo desenvolvidos constantemente de forma setorizada, relatando a ocorrência do agravamento de doenças e da qualidade de vida da população e a sua relação com os fatores socioambientais^{2,30}.

Nesse contexto, estudos sobre doenças endêmicas, como a hanseníase, que têm utilizado a ferramenta do geoprocessamento para explicar as possíveis interferências da transmissibilidade e da endemia. Cury et al⁷ encontraram relação da doença com fatores sócio-econômicos, mas não com densidade populacional, como aventado até então. Outras investigações analisam a distribuição espacial da doença em estudos descritivos e transversais, com a intenção de compreender a ocorrência geográfica da endemia e de propor ações de vigilância^{31,32}. Por sua vez, Opromolla et al³³ verificou a distribuição das taxas médias de detecção da hanseníase no estado de São Paulo e identificou discreto declínio nos maiores percentuais encontrados nas regiões oeste e noroeste do estado no período compreendido entre os anos de 1991 e 2002. De forma subsequente a esse estudo, Rodrigues-Junior³⁴ analisou o período compreendido entre os anos de 2004

e 2006 e confirmou o declínio da endemia para a maioria das regiões do estado de São Paulo, enquanto que, para a análise espacial, constatou que os coeficientes referentes ao norte do estado são altos.

O uso do geoprocessamento também pode permitir uma análise histórica da demanda do atendimento nos serviços de saúde em áreas endêmicas da doença, assim como estudado por Lapa et al³⁵, que constatou que, após a municipalização, houve um aumento da detecção e de tratamento da hanseníase pelo município, otimizando, assim, o atendimento das unidades de saúde e produzindo importantes alterações nos indicadores epidemiológicos e operacionais. Esses estudos sustentam cientificamente o direcionamento das ações em vigilância e saúde.

Ainda nesse contexto, Sakamuri et al³⁶ realizou estudo sobre epidemiologia molecular utilizando Polymerase Chain Reaction (PCR) em espécimes clínicos de pacientes com hanseníase, e demonstrou a distribuição geográfica e a frequência das variações genéticas do bacilo em cada um dos locais estudados.

No que tange a estudos sobre a dengue, Flauzino et al³⁷ verificou que os setores censitários mostram heterogeneidade espacial em relação às condições de vida, que, dentro de alguns setores, há diferenciais na distribuição espacial e temporal do risco de ocorrência da dengue e que a parcela economicamente ativa foi a mais atingida na área de estudo. A identificação dos locais que albergaram aglomerados de casos de dengue e sua caracterização demográfica e socioeconômica fornecem informações relevantes acerca do comportamento espacial dessa enfermidade, especialmente em ambientes urbanos diversos^{38,39}. Estudo de revisão realizado por Flausino et al com propósito de avaliar o comportamento da doença identificou que, pelo fato de a dengue estar relacionada às características ecológicas do ambiente, os estudos devem utilizar não somente a geotecnologia (agregados de unidades espaciais), mas também associar esse recurso às características ambientais locais e a indicadores sociodemográficos para ampliar o entendimento da epidemia da dengue³⁷. Nesse sentido, a atuação de forma integrada entre os Agentes de Controle de Vetores e os Agentes Comunitários de Saúde de um mesmo município pode ser um fator que contribui para o controle da doença⁴⁰.

Há ainda estudo sobre o “*Monitoramento Inteligente da Dengue*” (*MI-Dengue*), que associou a utilização de mapas georreferenciados em tempo real que integram um sistema informatizado de coleta e

de monitoramento de adultos de *Aedes aegypti* com o objetivo de identificar áreas em situações “*alerta*”, “*crítica*” e “*sem risco*”, permitindo, assim, ações de controle. Os resultados indicaram que realizar visitas em todas as casas que estão localizadas em um raio de até 200 metros de distância da armadilha positiva pode contribuir para a redução de casos de dengue⁴¹. Ainda em relação à dengue, Santos⁴² também utilizou o geoprocessamento para verificar a distribuição espacial de *Aedes albopictus* e a ocorrência de febre amarela e de dengue entre os anos de 1997 e 2002 no Brasil.

Em relação à tuberculose, a incidência da doença e a coinfeção HIV/tuberculose mostraram-se mais altas em áreas de maior vulnerabilidade social, apontando uma distribuição espacial não homogênea com a identificação de áreas de risco nos estudos que utilizaram o geoprocessamento, sendo o uso dessa tecnologia eficaz para o planejamento das ações em saúde pelos gestores municipais^{43,44}.

Em estudo epidemiológico realizado na região norte do país identificou-se a distribuição espaço-temporal, a estrutura do Programa de Controle da Tuberculose e sua interação com a rede de Atenção Básica de Saúde. A maioria dos casos ocorreu em zona urbana, com notificação de ao menos um caso em cada bairro, porém a maior parte dos diagnósticos (75 %) foi realizada pelos serviços especializados (hospitais e serviços de referência), sendo que a rede de atenção básica notificou apenas 25 % dos casos⁴⁵.

Outra investigação detectou a distribuição espacial e temporal das incidências brutas e ajustadas da TB, identificando áreas de maior risco para indígenas e não-indígenas no norte do País. As evidências apontaram que o grupo de indígenas é mais vulnerável ao adoecimento, mostrando, por meio de mapas temáticos, as áreas que requerem maior atenção para o controle da doença⁴⁶.

Técnicas de análise espacial mostraram áreas de maior incidência da tuberculose na tríplice fronteira Brasil, Paraguai e Argentina. Com a utilização de mapas, a investigação detectou *cluster* espacial de municípios com incidência maior e acima da média estadual quando comparado a regiões que não são de fronteira, indicando alto risco de transmissão da tuberculose, possivelmente devido à grande mobilidade populacional, o que aumenta a vulnerabilidade⁴⁷.

Considerando que a maioria dos estudos e o próprio Programa Nacional de Controle da Tuberculose priorizam intervenções para adultos, um estudo

desenvolvido em um estado brasileiro endêmico enfocou a distribuição da tuberculose infantil para estimativa de risco e identificou áreas de transmissão recente, que podem estar relacionadas com contatos intradomiciliares⁴⁸.

O uso do geoprocessamento estende-se, ainda, à investigação da distribuição dos casos ou de fatores relacionados de outras doenças crônicas, como diabetes e hipertensão arterial^{49,50}. Essa ferramenta pode colaborar para o mapeamento digital das áreas de abrangência das Unidades de Saúde e da assistência realizada pelos profissionais de saúde.

Assim, diante da diversidade de estudos mencionados ao longo deste trabalho, é possível considerar que, apesar de a preocupação de estudar as relações entre o meio e o ser humano não ser recente, as novas tecnologias incorporadas a esses estudos podem facilitar a compreensão da distribuição das doenças em uma determinada área. Nesse sentido, a incorporação de um geoprocessamento permite a identificação de áreas heterogêneas e colabora com subsídios para a vigilância epidemiológica, permitindo escolhas de estratégias e a realização de intervenções específicas, de acordo com a necessidade da população, bem como a priorização de recursos para grupos mais vulneráveis²⁹.

CONCLUSÃO

O uso do geoprocessamento constitui uma importante ferramenta para a identificação, a localização e o acompanhamento de populações, principalmente nas periferias dos grandes centros urbanos. Contribui, ainda, para o estudo da transmissão, disseminação e das ações de controle das doenças e dos agravos de saúde de uma determinada área de abrangência.

REFERÊNCIAS

1. Rocha CHB. Geoprocessamento: tecnologia transdisciplinar. Juiz de Fora (MG):Doador; 2000.
2. Chiesa AM, Westphal MF, Kashiwagi NM. Geoprocessamento e a promoção da saúde: desigualdades sociais e ambientais de São Paulo. *Rev Saúde Pública*. 2002;36(5):559-67.
3. Barcellos C, Santos SM. Colocando dados no mapa: a escolha da unidade espacial de agregação e integração de bases de dados em saúde e ambiente através do geoprocessamento. *Inf Epidemiol SUS*. 1997;5(1):21-9.
4. Brêtas G, Bessa R. Um sistema geográfico de informações para o controle da malária na Amazônia. *Inf Epidemiol SUS*. 1996; 5(3):73-81.

5. Nobre FF, Braga AL, Pinheiro RS, Lopes JS. SIGEPI: um sistema básico de informação geográfica para o apoio a vigilância epidemiológica. *Inf Epidemiol SUS*. 1996;5(3):59-72.
6. Oliveira C. Dicionário de cartográfico. 3ª ed. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 1987.
7. Cury MRCO, Paschoal VDA, Nardi SMT, Chierotti AP, Rodrigues Junior AL, Chiaravalloti Neto F. Spatial analysis of leprosy incidence and associated socioeconomic factors. *Rev Saúde Pública*. 2012;46(1):110-8.
8. Ferreira RA, Ferriani MGC, Mello DF, Carvalho IP, Cano MA, Oliveira LA. Análise espacial da vulnerabilidade social da gravidez na adolescência/Spatial analysis of the social vulnerability of adolescent pregnancy. *Cad Saúde Publica*. 2012; 28(2):313-23.
9. Guimarães RB, Ribeiro H. O tratamento cartográfico da informação em saúde do trabalhador/ Mapping of information on worker's health. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13(4):577-86.
10. Pessoa S. Ensaio médicos sociais. São Paulo (SP): Cebes/Hucitec; 1978.
11. Almeida Filho NM. For a General Theory of Health: preliminary epistemological and anthropological notes. *Cad Saúde Pública*. 2001;17(4):753-99.
12. Pyle GF. Applied Medical Geography. Washington (DC): Halsted Press; 1979.
13. Ferreira MU. Epidemiologia e geografia: o complexo patogênico de Max Sorre. *Cad Saúde Pública*. 1991;7:301-9.
14. Barreto ML. Esquistossomose mansônica: distribuição da doença e organização social do espaço [dissertação de mestrado]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 1982.
15. Silva LJ. Organização do espaço e doença. In: Carvalheiro JR. Textos de apoio. Epidemiologia I. Rio de Janeiro: Programa de Educação Continuada/Escola Nacional de Saúde Pública/Abrasco; 1985. p.159-85.
16. Paim JS. Abordagens teórico-conceituais em estudos de condições de vida e saúde: notas para reflexão e ação. In: Barata RB, organizador. Condições de vida e situação de saúde: saúde e movimento. Rio de Janeiro: ABRASCO; 1997. p.7-30.
17. Barata RCB, Ribeiro MCSA, Guedes MBL, Moraes JC. Intra-urban differentials in death rates from homicide in the city of São Paulo, Brazil, 1988-1994. *Soc Sci Med*. 1998;47(1):19-23.
18. Feuerwerker L, Costa H. Intersetorialidade na rede UNIDA. *Divulg Saúde Debate*. 2000; (22):25-35. Disponível em: [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=392897&indexSearch=ID].
19. Lamparelli RAC, Rocha JV, Borghi E. Geoprocessamento e agricultura de precisão: fundamentos e aplicações. Guaíba (RS): Aprovecuária; 2001.
20. Rodriguez PD. Variações espaciais de fatores de risco em saúde em áreas geográficas pequenas. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1996.
21. Pereira GC. Dados geográficos: aspectos e perspectivas. Salvador (BA): Quarteto/UFBA/ Faculdade de Arquitetura; 2002.
22. Barcellos C, Ramalho W. Situação atual do geoprocessamento e da análise de dados espaciais na saúde no Brasil. *Inform Pública*. 2002;4(2):221-30.
23. Mendes EV. Um novo paradigma sanitário: a produção social da saúde. In: Mendes EV. Uma agenda para a saúde. 2ª ed. São Paulo (SP): Hucitec; 1999. p.233-300.
24. Paschoal JAA. Estudo do ambiente ocupado e da edificação, e sua relação com as doenças transmissíveis [tese de doutorado]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2008.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica. Programa de saúde da família, caderno 1. A implantação da unidade de saúde da família. Brasília, DF, 2000.
26. Santos MA. Natureza do espaço, técnica e tempo, razão e emoção. São Paulo (SP): Hucitec; 1996.
27. Brasil. Secretaria de Estado da Saúde. Decreto nº 12.342, de 27 de setembro de 1978. Aprova o Regulamento a que se refere o artigo 22 do Decreto-Lei nº 211, de 30 de março de 1970, que dispõe sobre normas de promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado da Saúde. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 01 jan. 1979.
28. Penna MLE, Oliveira MLWdeR, Penna G. Spatial distribution of leprosy in the Amazon Region of Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(4):650-2.
29. Hino P, Villa TCS, Cunha TN, Santos CB. Distribuição espacial de doenças endêmicas no município de Ribeirão Preto (SP). *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011;16(Supl 1):1289-94.
30. Ferreira ALA, Eduardo ARB, Dantas ACCL. Geografias e topografias médicas: os primeiros estudos ambientais da cidade concreta. *Invest Geográficas, Bol Inst Geografia UNAM*. 2003; 52:83-98.
31. Gauy JS, Hino P, Santos CB. Spatial distribution of leprosy cases in Ribeirão Preto, Brazil, 2004. *Rev Latinoam Enferm*. 2007;15(3):460-5.
32. Amaral EP, Lana FCF. Análise espacial da Hanseníase na microrregião de Almenara, MG, Brasil. *Rev Bras Enferm*. 2008; 61(Esp):701-7.
33. Opromolla PA, Dalben I, Cardim M. Análise da distribuição espacial da hanseníase no Estado de São Paulo, 1991-2002. *Rev Bras Epidemiol*. 2005;8(4):356-64.
34. Rodrigues Junior ALO, Ó VT, Motti VG. Estudo espacial e temporal da hanseníase no estado de São Paulo, 2004-2006. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(6):1012-20.
35. Lapa TM, Albuquerque MFPM, Carvalho MS, Silveira Junior JC. Análise da demanda de casos de hanseníase aos serviços de saúde através do uso de técnicas de análise espacial. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(12):2575-83.
36. Sakamuri RM, Kimura M, Li W, Kim HC, Lee H, Kiran MD. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2844-54.
37. Flauzino RF, Souza-Santos R, Oliveira RM. Dengue, geoprocessamento e indicadores socioeconômicos e ambientais: um estudo de revisão. *Rev Panam Salud Pública*. 2009;25(5):456-61.
38. Vilaça PJ. Dengue no município de São Paulo: uma análise por Geoprocessamento [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
39. Barbosa GL, Lourenco RW. Análise da distribuição espaço-temporal de dengue e da infestação larvária no município de Tupã, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(2):145-51.

40. Chiaravalloti-Neto F, Barbosa AAC, Cesarino MB, Favaro EA, Mondini A, Ferraz AA, et al. Controle do dengue em área urbana do Brasil: avaliação do impacto do Programa Saúde da Família com relação ao programa tradicional de controle. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(5):987-97.
41. Eiras AE, Resende MC. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Cad Saúde Pública*. 2009;25(Suppl 1): S45-S58.
42. Santos RLC. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev Saúde Pública*. 2003;37(5):671-3.
43. Brunello MEF, Chiaravalloti-Neto F, Arcêncio RA, Andrade RLP, Magnabosco GT, Villa TCS. Áreas de vulnerabilidade para co-infecção HIV-aids/TB em Ribeirão Preto, SP. *Rev Saúde Pública*. 2011;45(3):556-63.
44. Hino P, Villa TCS, Cunha TN, Santos CB. Padrões espaciais da tuberculose e sua associação à condição de vida no município de Ribeirão Preto. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011;16(12):4795-802.
45. Nascimento MCL. “Tuberculose no município de Porto Velho - Rondônia no período de 1997 a 2008: um estudo ecológico” [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca;2010.
46. Melo TEMP, Resendes APC, Souza-Santos R, Basta PC. Distribuição espacial e temporal da tuberculose em indígenas e não indígenas de Rondônia, Amazônia Ocidental, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2012;28(2):267-80.
47. Braga JU, Herrero MB, Cuellar CM. Transmissão da tuberculose na tríplice fronteira entre Brasil, Paraguai e Argentina. *Cad Saúde Pública*. 2011;27(7):1271-80.
48. Sales CMM, Figueiredo TAM, Zandonade E, Maciel ELN. Análise espacial da tuberculose infantil no estado do Espírito Santo, 2000 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):435-9.
49. Bramlage P, Binz C, Gitt AK, Krekler M, Plate T, Deeg E, et al. Diabetes treatment patterns and goal achievement in primary diabetes care (DiaRegis) - study protocol and patient characteristics at baseline. *Cardiovasc Diabetol*. 2010; 9:53.
50. Campos FG, Barrozo LV, Ruiz T, César CLG, Barros MBA, Carandina L, et al. Distribuição espacial dos idosos de um município de médio porte do interior paulista segundo algumas características sócio-demográficas e de morbidade. *Cad Saúde Pública*. 2009;25(1):77-86.

Concentração de alfa-tocoferol em colostro humano e em fórmulas infantis e o atendimento ao requerimento nutricional do recém-nascido

Concentration of alpha-tocopherol in human colostrum and infant formulas and the compliance with the newborn nutritional requirement

RIALA6/1563

Larisse Rayanne Miranda de MELO, Heleni Aires CLEMENTE, Roberto DIMENSTEIN*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. Av. Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, CEP 59072-970 – Natal, RN. Tel.: (84) 32153416, ramal 205. E-mail: rdimenstein@gmail.com
Recebido: 19.02.2013 - Aceito para publicação: 27.09.2013

RESUMO

Os teores de alfa-tocoferol foram determinados no colostro humano e nas fórmulas infantis, para verificar se estas amostras atendem ao requerimento nutricional do recém-nascido quanto à vitamina E. Foi realizado estudo por corte transversal em amostras de 82 lactantes. O colostro foi coletado em jejum imediatamente o pós-parto; e o alfa-tocoferol foi determinado pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As fórmulas infantis foram coletadas em supermercados, selecionando-se quatro marcas (F1, F2, F3, F4) específicas para crianças de 0-6 meses, e as concentrações de alfa-tocoferol indicadas no rótulo. A concentração média de alfa-tocoferol no colostro foi de $1479 \pm 807,7$ $\mu\text{g/dL}$, que corresponde à oferta de 7,3 mg por dia; e nas fórmulas infantis foi de $810 \pm 182,4$ $\mu\text{g/dL}$, equivalente à oferta de 4,1 mg/dia. O leite de colostro forneceu 43 % de alfa-tocoferol a mais do que as fórmulas, e superior em 82 % em relação à recomendação para a faixa etária. A fórmula F3 forneceu apenas 68 % da recomendação diária de alfa-tocoferol e valores acima de 4mg/dia nas demais fórmulas. O colostro forneceu alfa-tocoferol em quantidade superior às fórmulas infantis, e nem todas as fórmulas dispõem alfa-tocoferol em quantidade superior ao recomendado para suprir as necessidades e formar reservas para recém-nascido.

Palavras-chave. alfa-tocoferol, colostro, fórmulas infantis, requerimento nutricional.

ABSTRACT

This study compared the alpha-tocopherol contents in human colostrum and infant formulas, and the vitamin E requirements for newborns were assessed in the both samples. To perform this cross-sectional study, the colostrums samples were collected from 82 lactating women, under fasting conditions, and immediately after postpartum period. Alpha-tocopherol contents were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Four brands of infant formula (F1, F2, F3, and F4), appropriate for children aged 0–6 months, were obtained from a supermarket. The mean alpha-tocopherol concentration in the colostrum was 1479 ± 807.7 $\mu\text{g/dL}$, and in the formulas was 810 ± 182.4 $\mu\text{g/dL}$, which corresponded to the availability of 7.3 mg/day and 4.1 mg/day, respectively. The alpha-tocopherol concentration in colostrum was 43 % higher than that in infant formulas, and 82 % higher than those the age-related recommended contents. The F3 formula contained 68 % of the recommended daily dose of alpha-tocopherol only; and the other formulas showed concentrations of >4 mg/day. Therefore, the colostrum provides alpha-tocopherol in an amount higher than that found in infant formula, and not all of the formulas provided alpha-tocopherol in quantities higher than those recommended to meet the needs and to form alpha-tocopherol reserves for newborns.

Keywords. alpha-tocopherol, colostrum, infant formula, nutritional requirements.

INTRODUÇÃO

O termo vitamina E se refere a um grupo de oito compostos lipossolúveis (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol), sendo que apenas o alfa-tocoferol atende ao requerimento nutricional para humanos¹.

Esta vitamina apresenta-se relevante por ser capaz de exercer efeito protetor sobre o binômio mãe-filho, evitando possíveis danos oxidativos². Concomitante a isso, a deficiência deste micronutriente no recém-nascido tem sido associada à anemia hemolítica e compromete o desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente em pré-termos^{1,3}.

Em função da transferência placentária limitada de vitaminas lipossolúveis, o recém-nascido apresenta reservas corpóreas reduzidas de alfa-tocoferol³. Sendo assim, o leite materno, especialmente o colostro, deverá garantir o fornecimento desse micronutriente em quantidades que sustentem a formação de reservas no recém-nascido, garantam a proteção do organismo contra a toxicidade do oxigênio e estimulem o desenvolvimento do sistema imunológico⁴. Segundo a Dietary Reference Intake (DRI), a quantidade capaz de assegurar o aporte adequado de alfa-tocoferol, bem como a formação de reservas, é de 4 mg/dia para crianças de 0 a 6 meses⁵.

O incentivo ao aleitamento materno apresenta-se como uma medida de prioridade nacional no combate à morbidade e mortalidade infantil por se tratar de uma estratégia eficaz e de baixo custo⁶. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2001) preconiza o fornecimento exclusivo de leite materno até os seis primeiros meses de vida da criança⁷.

Apesar desta recomendação da OMS, no Brasil há a interrupção precoce desta prática, sendo este um dos mais importantes problemas de saúde pública⁸. Os resultados da II Pesquisa Nacional de Aleitamento Materno⁹ mostraram que apenas 41 % das crianças menores de seis meses de idade são amamentadas, exclusivamente, corroborando com outros estudos nacionais, que apontam frequência elevada de consumo precoce de chás, água, suco, outros leites e fórmulas complementares¹⁰⁻¹². No Nordeste, essa frequência é ainda menor, evidenciando que apenas 37 % das crianças são amamentadas até os seis meses, revelando a menor frequência de amamentação do país⁹. Esse dado é ainda mais preocupante, uma vez que esta é a região com as maiores taxas de mortalidade infantil no Brasil e há inúmeros estudos que revelam associação entre

o uso precoce de outros leites e a morbimortalidade infantil^{13,14}.

Ocorre, portanto, uma introdução precoce de alimentos ou fórmulas que pode acarretar o aumento da morbimortalidade infantil devido à menor ingestão dos fatores de proteção existentes no leite materno, como as imunoglobulinas e micronutrientes antioxidantes¹⁵.

A Resolução RDC n° 43, de 19 de setembro de 2011, da Anvisa, preconiza que essas fórmulas devem ser capazes de satisfazer por si só as necessidades nutricionais dos lactentes durante os seis primeiros meses de vida¹⁶. No entanto, esses produtos estão expostos a fatores como o período e a temperatura de armazenamento, atividade de água, umidade e reconstituição adequada¹⁷. Sendo assim, é esperado que esses alimentos possuam conteúdo de alfa-tocoferol superior ao requerimento diário do recém-nascido compatível com as possíveis perdas no intuito de diminuir a probabilidade de comprometimento no aporte de alfa-tocoferol.

Uma vez que a Sociedade Brasileira de Pediatria recomenda o uso de fórmulas infantis para neonatos que não podem ingerir leite materno¹⁸ e que o alfa-tocoferol é um nutriente de extrema importância, principalmente nos primeiros dias de vida, é relevante verificar se os valores da vitamina, fornecidos pelo colostro, bem como pelas fórmulas infantis, atingem o valor de Ingestão Diária Recomendada (% da DRI), atendendo, assim, ao requerimento nutricional do recém-nascido para Vitamina E.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi de caráter transversal, realizado entre janeiro e dezembro de 2012, no qual o processo de definição da amostra foi baseado em demanda espontânea, em que todas as puérperas que necessitaram de internação após o parto, no período especificado, foram submetidas aos critérios de triagem definidos para este estudo.

Todos os procedimentos do estudo foram conduzidos de acordo com os padrões exigidos pela Declaração de Helsink¹⁹ e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, CAAE-0260.0.051.294-11.

O leite colostro foi coletado de 82 lactantes adultas, entre 18-40 anos, sem patologias associadas (diabetes, hipertensão, neoplasias, doenças do trato gastrointestinal e hepáticas, cardiopatias, infecciosas,

sífilis, HIV positivo) que tiveram partos a termo, ocorrido a mais de 12 horas do momento da coleta, com conceito único, sem má-formação e que não fizeram uso de suplementos vitamínicos durante a gestação.

A partir do primeiro dia pós-parto, durante dois dias consecutivos, foram coletados 2 mL de colostro no período da manhã após jejum noturno. O leite foi obtido por expressão manual de uma única mama, sempre no final da mamada, para tentar evitar flutuações no teor de gordura.

As amostras foram coletadas em tubos de polipropileno protegidos da luz, transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Uma vez no laboratório, o leite foi colocado em banho-maria a 37 °C, homogeneizado, retirada à alíquota de 500 µL e, por fim, colocado em tubo de polipropileno protegido da luz e armazenado a -18 °C até o momento das análises.

Para o leite, foi utilizada metodologia adaptada de Romeu-Nadal et al²⁰, em que, em 500 µL de colostro, foram adicionados igual quantidade de etanol a 95 % (Merck, São Paulo, Brasil). O tubo, contendo a mistura, foi agitado mecanicamente por 1 minuto. O processo extrativo foi realizado em duas etapas com dois mililitros de hexano cada (Merck, São Paulo, Brasil), agitado mecanicamente por mais 1 minuto e centrifugado (10 min, 1073G), resultando em uma extração total de 4 mL da fase hexânica.

Metade do combinado orgânico obtido foi evaporado, utilizando nitrogênio. O extrato seco foi dissolvido em 500 µL de etanol absoluto, grau CLAE (Merck, São Paulo, Brasil), para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa.

As concentrações de α-TOH foram determinadas por CLAE com cromatógrafo Shimadzu® LC-20AT, equipado com loop injetor de 20 µL, comunicador CBM 20 A e acoplado a um Detector SPD-20A UV-VIS, com detecção UV ($\lambda_{\text{max}}=292$ nm). A separação cromatográfica foi realizada com coluna de fase reversa LC Shim-pack® CLC-ODS(M) 4,6 mm x 25 cm. A eluição foi isocrática, com fase móvel composta de metanol/água ultrapura (Mili-Q) em 97:3(v:v) com fluxo 1,0 mL/min. Os cromatogramas foram integrados, utilizando o programa LC- solution®.

A identificação e quantificação do alfa-tocoferol

nas amostras foram estabelecidas por comparação da área do pico obtido no cromatograma com a área do respectivo padrão de alfa-tocoferol SIGMA®.

A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico²¹ em etanol absoluto grau CLAE (Merck, São Paulo, Brasil), ϵ 1 %, 1 cm = 75,8.

Para avaliar a oferta de alfa-tocoferol pelo leite materno, foi adotada uma ingestão diária de 500 mL de colostro e comparada com a Dietary Reference Intake (DRI) para crianças de 0 à 6 meses, equivalente à 4 mg/dia^{5,22}.

Para determinar a precisão e exatidão, foram realizados os testes de recuperação e repetitividade expressa por desvio padrão relativo (DPR), com três concentrações (50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL), contemplando a faixa de variação dentro da curva de linearidade.

A taxa de recuperação média de alfa-tocoferol no leite colostro foi de 98,8 %. As medições foram caracterizadas por repetibilidade satisfatória, com DPR de soro e leite 7,70 %.

Para determinação do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), uma amostra de leite colostro de concentrações conhecidas foi diluída em diversas concentrações. Cada diluição da amostra foi aplicada e o pico observado de forma que o LD foi determinado quando não houve mais distinção entre ruído e o sinal analítico, sendo atingido na concentração de 0,48 µg/mL e o LQ foi determinado quando o sinal analítico foi detectado na menor diluição equivalente a 0,97 µg/mL²³.

A curva de calibração para α-TOH foi linear dentro de 1,2- 41,3 µg/mL ($r^2 = 0,9998$) e realizada com seis soluções de concentrações diferentes, obtidas a partir de uma solução-mãe de padrão de alfa-tocoferol (Sigma®).

Para a comparação do conteúdo de alfa-tocoferol das fórmulas infantis, foram escolhidas, no supermercado, quatro marcas específicas para crianças de 0 a 6 meses, que apresentavam a concentração de alfa-tocoferol no rótulo. As marcas foram denominadas como F1, F2, F3 e F4.

No cálculo da concentração de alfa-tocoferol, foram observadas as instruções fornecidas pelo rótulo para a reconstituição. As orientações de reconstituição das marcas F1, F2, F3 e F4 foram de 13,7 g, 13,3 g, 12,9 g e 13,1 g de pó para 90 mL de água, respectivamente. Baseando-se na concentração desse micronutriente em 100 mL, foi feita a relação direta para 500 mL, mesmo volume utilizado para o cálculo no colostro.

RESULTADOS

A concentração média de alfa-tocoferol encontrada no colostro foi de 1479 ± 808 $\mu\text{g/dL}$, revelando uma oferta de 7,3 mg por dia, enquanto que a concentração média informada no rótulo das fórmulas foi de 810 ± 182 $\mu\text{g/dL}$, evidenciando a oferta de 4,1 mg/dia. Estas concentrações das fórmulas encontram-se elencadas na Tabela 1. Os valores de alfa-tocoferol fornecidos por dia pelo colostro e pelas fórmulas foram calculados a partir do volume de ingestão diária do recém-nascido de 500 mL²².

Ao analisar individualmente as fórmulas, foi evidenciado que a concentração de alfa-tocoferol da marca F3 oferta apenas 68 % da recomendação preconizada para a faixa etária. As demais fórmulas apresentaram, em seu rótulo, valores de alfa-tocoferol acima de 4 mg/dia.

Ao comparar o colostro com as fórmulas infantis, o primeiro fornece concentração média superior em 3,2 mg/dia de alfa-tocoferol (Figura 1) e, ao compararmos com a AI, o colostro provê 82 % mais que o recomendado pelo Institute of Medicine – IOM⁵.

Tabela 1. Concentrações de alfa-tocoferol obtidas a partir do rótulo de quatro marcas de fórmulas infantis recomendadas para crianças de 0 a 6 meses em comparação com o colostro

Concentrações					
Amostras	F1	F2	F3	F4	Colostro
100 g de pó	6,5 mg*	7,0 mg*	4,2 mg*	6,5 mg*	-
500 mL	4,5 mg**	4,7 mg**	2,7 mg**	4,3 mg**	7,6 mg***

* Valores obtidos no rótulo das respectivas fórmulas infantis; ** Valores obtidos a partir da informação nutricional de alfa-tocoferol em 100 mL de fórmula infantil reconstituída, fazendo a correspondência direta para 500 mL; *** Concentrações obtidas pela determinação de alfa-tocoferol nas amostras de colostro utilizadas no presente estudo.

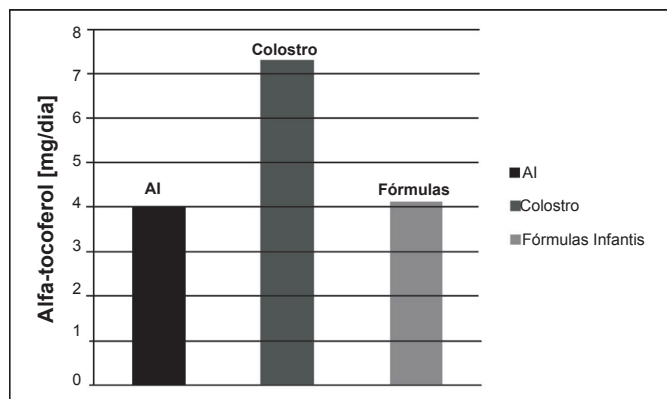


Figura 1. Comparativo entre o conteúdo de alfa-tocoferol ofertado pelo colostro e fórmulas infantis com a Ingestão Adequada (AI)

DISCUSSÃO

A concentração média de alfa-tocoferol no leite colostro foi de 1479 ± 808 $\mu\text{g/dL}$. Tal concentração foi semelhante a estudos realizados na Turquia (1327 ± 69 $\mu\text{g/dL}$)²⁴ e nos Estados Unidos (1335 ± 198 $\mu\text{g/dL}$)²⁵.

Quanto às fórmulas infantis, foi encontrada uma concentração média de 810 ± 182 $\mu\text{g/dL}$. O leite colostro demonstra fornecer, em média, uma quantidade superior de alfa-tocoferol que as fórmulas infantis.

Sziklai-László et al²⁶ realizaram comparações entre o conteúdo de alfa-tocoferol, em fórmulas infantis, com o conteúdo desta vitamina no leite de transição e maduro. Foi verificado que a diluição recomendada no rótulo destas fórmulas diminuía de 6 a 8 vezes o conteúdo de tocoferol presente no pó não-diluído e que o conteúdo desta vitamina fornecido pelas fórmulas foi significativamente menor do que o ofertado pelo leite materno em ambas as fases de lactação.

Ao comparar a provável ingestão de leite diária com a recomendação de vitamina E para menores de 6 meses, pode-se observar que a quantidade consumida pelo recém-nascido atinge as 4 mg/dia de alfa-tocoferol recomendadas, tanto para o leite colostro, quanto para as fórmulas infantis (Figura 1).

Entretanto, ao analisar individualmente os rótulos das fórmulas, foi evidenciado que a concentração de alfa-tocoferol da marca F3 oferta apenas 68 % da recomendação preconizada. As demais fórmulas apresentaram seus valores de alfa-tocoferol acima de 4 mg/dia, todavia, estas apresentam concentrações inferiores quando comparadas ao leite colostro, que fornece 82 % a mais que a AI.

Não se sabe, ao certo, se 4 mg/dia de alfa-tocoferol seriam suficientes nesta fase de lactação, uma vez que para a determinação da DRI de alfa-tocoferol para lactentes de 0 a 6 meses foi analisada apenas a média de ingestão deste nutriente a partir dos dois meses de lactação⁵. Portanto, não leva em consideração o primeiro mês de vida, fase em que o recém-nascido tem um desequilíbrio do sistema antioxidante²⁷, devido à transição para o ambiente extra-uterino, significativamente mais rico em oxigênio^{28,29}.

Segundo Sziklai-László et al²⁶, a fase de lactação é um fator determinante para o conteúdo de alfa-tocoferol no leite. Porém, independente da fase de lactação, autores afirmam que o alfa-tocoferol presente no leite materno é mais biodisponível que a ofertada nas fórmulas infantis^{30,31}.

Além disso, as fórmulas infantis apresentam alto poder de oxidação e estão expostas a fatores como luminosidade, pH e temperaturas adversas, fatores que podem facilitar a isomerização do alfa-tocoferol, conduzindo assim à perda total ou parcial do valor nutricional³², ou seja, sua utilização nos põe em dúvida se o aporte de alfa-tocoferol seria fornecido de forma adequada nos primeiros dias de vida.

Sendo assim, o leite colostro é capaz de fornecer uma quantidade superior de alfa-tocoferol quando comparado às fórmulas infantis. Este maior fornecimento pode garantir o suporte nutricional adequado e promover a formação de reservas da vitamina, além de fortalecer as defesas do recém-nascido³³.

O leite humano é indiscutivelmente o alimento que reúne as características nutricionais ideais, tais como: composição nutricional balanceada, biodisponibilidade de nutrientes, presença de fatores de crescimento, enzimas e hormônios, além de desenvolver inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas, importantes na diminuição da morbidade e mortalidade infantil, sendo importante para a mãe, família e sociedade em geral³⁴.

CONCLUSÃO

Ao comparar o colostro com as fórmulas infantis, fica evidenciado que, apesar de a maioria das fórmulas conter em seus rótulos informações que sugerem atingir o requerimento nutricional durante a primeira semana de vida do recém-nascido, o conteúdo de alfa-tocoferol ofertado é menor quando comparado ao do leite colostro. Além disso, nem todas as fórmulas infantis forneceram alfa-tocoferol em quantidade superior ao recomendado para suprir as necessidades e formar reservas de alfa-tocoferol para recém-nascido.

REFERÊNCIAS

1. Traber M. Vitamin E. In: Zempleni J, Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, editores - Handbook of vitamins. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 154-155.
2. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:1390-6.
3. Debier C. Vitamin E during pre- and postnatal periods. *Vitam Horm*. 2007;76:357-73.
4. Lira LQ, Ribeiro PR, Grilo EC, Lima MS, Dimenstein R. Níveis de alfa-tocoferol no soro e colostro de lactantes e associação com variáveis maternas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34: 362-8.
5. Institute of Medicine, Food Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids: a report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference. Washington (DC): National Academy Press 2000 [acesso 2012 Dez 6]. Disponível em: [http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309069351].
6. Souza SND, Migoto MT, Rossetto EG, Mello DF. Prevalência de aleitamento materno e fatores associados no município de Londrina-PR. *Acta Paul Enferm*. 2012;25:29-35.
7. World Health Organization - WHO. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Note for the press. 2001; 7.
8. Réa MF. Reflexões sobre amamentação no Brasil: de como passamos a 10 meses de duração. *Cad Saúde Publica*. 2003;19:37-45.
9. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal. Brasília, 2009. [acesso 2013 Abr 14]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvsm/publicacoes/pesquisa_prevalencia_aleitamento_materno.pdf].
10. Brunken GS, Silva SM, França GVA, Escuder MML, Venancio SI. Fatores associados à interrupção precoce do aleitamento materno exclusivo e à introdução tardia da alimentação complementar no Centro-oeste brasileiro. *J Pediatr*. 2006; 82: 445-51.
11. Alves CR, Goulart EM, Colosimo EA, Goulart LM. Fatores de risco para o desmame entre usuárias de uma unidade básica de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre 1980 e 2004. *Cad Saúde Publica*. 2008;24:1355-67.
12. Bernardi JL, Jordão RE, Barros F. Alimentação complementar de lactentes em uma cidade desenvolvida no contexto de um país em desenvolvimento. *Rev Panam Salud Publica*. 2009; 26: 405-11.
13. Victora CG, Smith PH, Vaughan JP, Nobre LC, Lombardi C, Teixeira AM, et al. Evidence for protection by breastfeeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet*. 1987;2:319-22.
14. McNeil ME, Labbok MH, Abrahams SW. What are the risks associated with formula feeding? A reanalysis and review. *Birth*. 2010; 37:50-8.
15. Giugliani ER, Victora CG. Complementary feeding. *J Pediatr*. 2000;76:253-62.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 43, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 21 set. 2011. Cap 1, seção 3, nº 1, p. 2-3.
17. Abranches MV, Della Lucia CM, Sartori MA, Pinheiro Sant'Ana HM. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. *Alim Nutr*. 2008;19(2):207-17.
18. Sociedade Brasileira de Pediatria - Departamento de Nutrologia. Manual de orientação: alimentação do lactente, alimentação do pré-escolar, alimentação do escolar, alimentação do adolescente, alimentação na escola. São Paulo: SBP 2006 [acesso 2012 Nov 20]. Disponível em: [www.sbp.com.br/img/manuais/manual_alim_dc_nutrologia.pdf].
19. World Medical Association - WMA. Declaration of Helsinki. Edinburgh, Scotland: 52nd General Assembly-WMA, 2000.
20. Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater

- MC. Determination of γ and α -tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *J Chromat A*.2006;1114: 132-7.
21. Nierenberg DW, Nann, SL. A method for determining concentrations of retinol,tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*. 1992;56: 417-26.
 22. Ross JS, Harvey PW. Contribution of breastfeeding to Vitamin A nutrition of infants: a simulation model. *Bull WHO*. 2003; 81: 80-6.
 23. Ribani M, Botolli CB, Jardim IC, Melo LF. Validação de métodos cromatograficos e eletroforeticos. *Quim Nova*. 2004; 27:771-80.
 24. Orhon FS, Ulukol B, Kahya D, Cengiz B, Baskan S, Tezcan S. The influence of maternal smoking on maternal and newborn oxidant and antioxidant status. *Eur J Pediatr*. 2009;168:975-81.
 25. Gossage J, Deyhim M, Yamini S, Douglass LW, Phylis E, Moser-Veillon B. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to β -carotene supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:193-7.
 26. Sziklai-László I, Majchrzak D, Elmadfa I, Cser M. Selenium and vitamin E concentrations in human milk and formula milk from Hungary. *J Radioanal Nucl Chem*. 2009;279:585-90.
 27. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:181-8.
 28. Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev*. 2001;65:75-81.
 29. Gomes MM, Saunders C, Accioly E. Vitamin A role preventing oxidative stress in newborns. *Rev Bras Saude Matern Infant*. 2005;5:275-82.
 30. Ostrea EM, Balun JE, Winkler T. Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and beta-carotene in the newborn infant. *Am J Obstet Gynecol*.1986;154:1014-7.
 31. Bendich A, Brock PE. Rationale for the introduction of long chain polyunsaturated fatty acids and for concomitant increase in the level of vitamin E in infant formulas. *Intern J Vitam Nutr Res*.1997;67:213-31.
 32. Paixão JA, Stamford TL. Vitaminas lipossolúveis em alimentos: uma abordagem analítica. *Quím Nova*. 2004;27(1):96-105
 33. Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab*. 2001; 45:82-5.
 34. Cyrillo DC, Sarti FM, Farina EM, Mazzon JA. Duas décadas da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes: há motivos para comemorar? *Rev Panam Salud Publica*. 2009;25:134-40.

Presença de inibidores de proteases em amostras comerciais de “faseolaminas” utilizadas como bloqueadores de carboidratos e os riscos à saúde

Occurrence of proteases inhibitors in commercial samples of “phaseolamins” used as carbohydrate blockers and the health risks

RIALA6/1564

Mariana dos Santos MURRA, Tassia Batista PESSATO, Olga Luisa TAVANO*

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Rua Getulio Guaritá nº 159, sala 323, Uberaba, MG, Brasil. CEP 38025-440, Tel./Fax: (34) 3318-5922, E-mail: tavanoool@yahoo.com.br

Recebido: 31.01.2013 - Aceito para publicação: 02.09.2013

RESUMO

Foi investigada a veiculação de inibidores de proteases, concomitante ao consumo de “faseolamina”, cuja ingestão diária e de maneira prolongada poderia estar associada ao risco no desenvolvimento de alterações morfológicas e metabólicas de pâncreas. Dez amostras foram obtidas em farmácias de manipulação no município de Uberaba – MG, as quais são comercializadas na forma de cápsulas como “faseolamina” e uma como “farinha de feijão branco”, além de amostra de farinha preparada a partir da trituração de feijões brancos (*Phaseolus vulgaris*) obtidos comercialmente, sem qualquer processamento. Estas amostras foram analisadas efetuando-se a determinação de atividade de inibidores de tripsina, a determinação de proteínas totais e de atividade de inibição de amilase. Todas as amostras estudadas apresentaram atividades de inibição de tripsina, porém com baixa ou mesmo inexistente inibição de amilase; e em algumas amostras foi detectada concentração de proteínas muito inferior ao esperado. Uma vez observada a presença de atividade de inibição de tripsina em todas as amostras estudadas, e pela inexistência de níveis seguros de consumo estabelecidos para o ser humano, e ainda baseando-se nos trabalhos sobre associação de ingestão prolongada destes inibidores com alterações de atividade pancreática, o consumo destes “bloqueadores de carboidratos” deveria ser melhor controlado.

Palavras-chave. faseolamina, inibidores de proteases, inibidores de tripsina, bloqueadores de carboidratos, inibidores de amilase, pâncreas.

ABSTRACT

This study aimed at verifying the risk in developing the metabolic and morphological changes in pancreas, owing to the use of daily and prolonged consumption of protease inhibitors in conjunction with “phaseolamine”. Ten samples were obtained from drugstores in the city of Uberaba – MG, sold as “phaseolamine” and one known as “white bean flour”, and also one flour sample produced from commercial white beans (*Phaseolus vulgaris*) without any processing. These samples were analyzed by determining the activity of trypsin inhibitors, the total protein and the amylase inhibition activity. Trypsin inhibition activity was found in all of analyzed samples; however, the amylase inhibition activity was low, and in some samples the protein concentration was much lower than expected. Seeing that the trypsin inhibitory activity was detected in all of analyzed samples, and considering that the prolonged ingestion of these inhibitors might cause activity changes in pancreas, the consumption of these types of “carbohydrate blockers” should be deeply discussed, since the safe amounts of these compounds have not been established for humans consumption yet.

Keywords. phaseolamine, protease inhibitors, trypsin inhibitors, starch blockers, amylase inhibitors, pancreas.

INTRODUÇÃO

A obesidade, considerada uma doença crônica em que há acúmulo excessivo de tecido adiposo a ponto de comprometer a saúde do indivíduo, vem alcançando níveis alarmantes nas últimas décadas em muitos países^{1,2}. Considerando-se a maior causa do ganho de peso como um “desbalanço” entre a ingestão e o gasto de energia, e que carboidratos são as maiores fontes de calorias nas dietas, algumas ações a respeito poderiam ser consideradas, como a recomendação de consumo de alimentos com baixo índice glicêmico ou da ingestão de componentes que possam reduzir a digestão e consequente absorção dos carboidratos³. Entre a mistura de carboidratos normalmente presentes nas dietas, o amido costuma ser de grande representatividade, e o primeiro passo para liberação de glicose advinda desta molécula é a ação da alfa-amilase, em especial a pancreática liberada no intestino. Desta forma, a inibição da alfa-amilase reduz a assimilação de carboidratos, com especial redução de picos de glicose pós-prandial, o que é particularmente importante no caso de pacientes diabéticos^{1,2}. Diferentes inibidores de amilases estão disponíveis, seja na forma de medicamentos, como a Acarbose, ou seja, na forma de outros suplementos, como extratos vegetais, sendo que dentre eles estão os derivados de farinhas de feijão branco, que trariam em sua composição inibidores de alfa-amilase^{4,5}.

Estes chamados “bloqueadores de carboidratos” (“*carbohydrates blockers*” ou “*starch blockers*”), embora se proponham a uma ação de grande importância e especial interesse a pacientes diabéticos, ainda geram muitas controvérsias, em especial no que se refere ao uso dos derivados de feijão branco. A faseolamina, uma proteína dos grãos, é a responsável por este efeito de inativação da α -amilase, sendo possível sua obtenção comercial por meio de produtos diretamente identificados como “faseolamina” ou mesmo “farinha de feijão branco”^{5,6}.

A utilização de faseolamina como auxiliar na inibição da absorção de carboidratos não é uma ideia recente. Na década 1980 houve grande consumo desses produtos comercializados como bloqueadores de carboidratos nos EUA, sendo que em julho de 1982 a FDA (Food and Drug Administration) interrompeu a distribuição de todos os inibidores de amilase até que se pudesse ter segurança sobre seus riscos e benefícios, quando estimava-se que em junho desse mesmo ano foram consumidas cerca de 10 milhões de cápsulas por semana neste país⁷. Desde então, a discussão sobre

o uso de tais compostos gera controvérsias. Autores alertam para a possível ineficiência destes inibidores em relação à digestão de carboidratos em seres humanos, e mesmo para os riscos embutidos em seu consumo. Carlson et al⁷ estudando a ação de inibidores de amilase comercializados, sobre voluntários com idade entre 23 e 32 anos, não verificaram quaisquer alterações sobre parâmetros como glicose sanguínea ou insulina. Embora diversos estudos demonstrem a presença e atividade de proteínas com potencial para inibição de amilase, estes estudos encontraram em seus protocolos *in vitro* condições favoráveis para esta inibição, o que *in vivo* não seria facilmente reproduzido, já que estes compostos sofreriam ação do suco gástrico em sua passagem pelo estômago e a ação de proteases digestivas rapidamente reduziria seu potencial de ação sobre as amilases pancreáticas, e, por outro lado, feijões apresentam outros componentes antinutricionais e tóxicos que poderiam ser veiculados conjuntamente, como lectinas e inibidores de proteases⁸. Liener et al⁹, ainda na década 1980, demonstraram a presença destes outros compostos em “bloqueadores de carboidratos” à base de farinha de feijão, comercializados nos Estados Unidos, alertando para os riscos da ingestão destes outros componentes, em especial os inibidores de proteases e, sobretudo, de maneira crônica.

Embora já se saiba que esta inibição ocorre com intensidades distintas entre tripsinas de espécies diferentes, como ratos, porcos, camundongos e seres humanos, alguns trabalhos demonstraram que a tripsina humana é também sensível à ação destes inibidores¹⁰⁻¹², o que poderia desencadear um mecanismo de hiperestimulação da secreção pancreática com consequente surgimento de hipertrofia e/ou hiperplasia das células acinares do pâncreas¹³⁻¹⁶. Ainda que em animais este fenômeno já tenha sido demonstrado, poucos estudos têm sido diretamente realizados com humanos, mas alguns trabalhos já indicam que esta relação poderia ocorrer. Holm et al¹¹ utilizando infusão de extrato de grãos crus de soja em 11 voluntários, por meio de sonda, verificaram uma inibição de 55 % de atividade de tripsina durante a infusão. Friess et al¹⁷ realizaram um estudo com 20 voluntários, com idades entre 24 e 28 anos, que receberam uma espécie de inibidor de tripsina, o “Camostato”, durante as refeições, e após duas semanas foi possível observar um aumento no tamanho das células acinares por exames de ultrassom.

Já no início do século XX, Osborne e Mendel observaram que era necessário submeter a soja a

tratamento térmico para que esta pudesse ser utilizada como alimento sem causar prejuízos no desenvolvimento daquele organismo que a consumia, fato inicialmente observado em animais, e logo se demonstrou que a presença de certos componentes na soja interferia na absorção de suas proteínas, estabelecendo claramente uma relação inversa entre o conteúdo de inibidores de proteases presentes na soja e a digestibilidade de suas proteínas^{8,18,19}.

A eficiente inativação térmica destes inibidores já foi demonstrada por inúmeros trabalhos²⁰⁻²⁶. Mas, infelizmente, embora o consumo habitual destes grãos seja predominantemente na forma cozida, há alguns fatos preocupantes, como a crescente inclusão destes “reguladores” de absorção de carboidratos, preparados com farinhas de feijões cujo processamento térmico não poderia ser intenso, de maneira a preservar a atividade de inibidores de amilase. Chokshi⁵ afirma que os produtos comercializados sob denominação de “faseolamina” isolada seriam farinhas de feijão branco que sofreram tratamento térmico controlado, ou seja, brando, o que permitiria que apenas a faseolamina, proteína inibidora de amilase, estivesse ativa, inativando-se os demais agentes tóxicos. Esta seria uma forma segura e desejável de consumo de inibidores de absorção de carboidratos.

Desta forma, este trabalho se propõe a analisar a presença de inibidores de proteases em amostras comerciais de “faseolamina” e “farinha de feijão branco”, destinados à redução da absorção de carboidratos, e discutir os riscos de sua ingestão para o ser humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Após consulta a farmácias de manipulação e locais de comercialização de “produtos naturais” encontrados no município de Uberaba – MG, foram obtidas 10 diferentes amostras, de distintos fornecedores, comercializadas sob a denominação de “faseolamina” e uma amostra comercializada como “farinha de feijão branco”, todas disponíveis em frascos contendo entre 30 e 60 cápsulas de 500 mg cada. Para todas as amostras, as cápsulas foram abertas, pesadas e seus conteúdos homogeneizados para utilização nos ensaios. Também se utilizou amostra de farinha preparada a partir da trituração de grãos *in natura* de feijões brancos (*Phaseolus vulgaris*) obtidos comercialmente, sem qualquer processamento.

Determinação da atividade de inibição de tripsina

A determinação da atividade de inibição de tripsina das amostras foi realizada como descrito por Kakade et al²⁷, utilizando-se BAPNA (Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato e tripsina de pâncreas bovino (Type I, 10.000 BAEE unidades/mg proteína, Sigma). Convencionou-se que 1 (uma) unidade de tripsina (UT) seria equivalente ao aumento de cada 0,01 de absorvância para as leituras das amostras. As atividades de inibição das amostras foram expressas considerando-se ensaio sem inibição (ausência de extrato) como 100 % de atividade, e a diferença entre as unidades de atividade determinadas para as amostras e aquela da enzima livre, como UIT (Unidades de Inibição de Tripsina), expressas por grama de amostra.

Determinação da atividade de inibição da amilase

Para determinação da atividade de inibição de amilase das amostras foi utilizada amilase pancreática suína (α -amilase Type VI, Sigma A 3176). As amostras passaram por processo de extração (1:20 m/v) utilizando-se tampão fosfato, 10 mM, pH 7,2, contendo 150 mM de NaCl, como descrito por Mosca et al²⁸. A determinação da atividade foi realizada utilizando-se solução de amido 1 % em tampão fosfato de sódio pH 6,9, 20 mM, contendo 6,7 mM de NaCl. Para a reação 80 μ L de solução de enzima foram incubados com 45 μ L de extrato. Após 10 minutos a 37 °C foram acrescentados 125 μ L de solução de substrato e novamente mantidos a 37 °C, por 20 min. A reação foi interrompida pela adição de reagente contendo DNS (ácido dinitrosalicílico) e os tubos foram mantidos sob fervura por 5 minutos. Após adição de 4,5 mL de água destilada, as leituras foram realizadas a 540 nm. Uma curva de referência de maltose foi utilizada para os cálculos. Foi definida 1 UA (Unidade de Atividade) como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ Mol de maltose. As atividades de inibição das amostras foram expressas considerando-se ensaio sem inibição (ausência de extrato) como 100 % de atividade, e a diferença entre as unidades de atividade determinadas para as amostras e aquela da enzima livre, como UIA (Unidades de Inibição de Amilase), expressas por grama de amostra.

Determinação de proteínas nas amostras

A determinação de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Kjeldahl²⁹, utilizando-se o fator 6,25 para conversão do teor de nitrogênio em proteínas.

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os resultados para inibições das enzimas digestivas encontrados para as 11 diferentes amostras dos produtos comercializados como “bloqueadores de carboidratos”, juntamente com o resultado encontrado para a amostra preparada de farinha de feijão branco não processado. Na Tabela 2 estão os resultados para concentração de proteínas nestas mesmas amostras.

Tabela 1. Atividades de inibição de enzimas digestivas em amostras de “faseolamina” e farinha de feijão branco

Amostra*	Unidades de Inibição**	
	UIT/g	UIA/g
1	9.250,00 ± 1,02	31,81 ± 0,29
2	1.840,00 ± 5,11	31,57 ± 0,10
3	2.055,50 ± 8,36	5,58 ± 0,29
4	1.707,90 ± 11,20	6,16 ± 0,16
5	1.623,76 ± 0,50	5,38 ± 0,44
6	1.331,73 ± 6,57	6,42 ± 0,51
7	1.257,43 ± 14,40	32,58 ± 0,22
8	2.487,62 ± 6,01	4,98 ± 0,62
9	600,00 ± 8,83	ND***
10	1.444,40 ± 4,57	6,12 ± 0,89
11	10.062,50 ± 3,78	32,49 ± 0,07
12	9.060,00 ± 8,84	32,94 ± 0,18

* Amostras 1 a 10 comercializadas como “faseolamina”; amostra 11 comercializada como farinha de feijão branco; amostra 12 farinha produzida a partir de feijões brancos triturados, sem qualquer tratamento térmico. ** UIT = Unidades de Inibição de Tripsina; UIA = Unidades de Inibição de amilase; *** ND= não detectada

Tabela 2. Concentração de proteínas de amostras de “faseolamina” e farinha de feijão branco

Amostra*	Proteínas Totais (g/ 100 g de amostra)
1	19,59
2	18,72
3	6,24
4	2,59
5	3,23
6	3,66
7	13,78
8	4,73
9	3,23
10	4,52
11	21,48
12	22,34

* Amostras 1 a 10 comercializadas como “faseolamina”; amostra 11 comercializada como farinha de feijão branco; amostra 12 farinha produzida a partir de feijões brancos triturados, sem qualquer tratamento térmico

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1 é possível verificar que todas as amostras estudadas apresentavam atividades de inibição de tripsina.

A amostra 1, ainda que comercializada sob a denominação de “faseolamina”, apresentou perfil muito semelhante ao encontrado para as amostras 11 e 12, representando amostras de farinhas de feijão branco, comercial e preparada, respectivamente, tanto no que se refere à atividade de inibição de tripsina detectada, como à atividade de inibição de amilase e percentual de proteínas (Tabelas 1 e 2).

As amostras 3 a 6 e 8 a 10 apresentaram atividades de inibição de amilase inferiores àquelas apresentadas pelas farinhas de feijão branco (amostras 11 e 12), sendo que a 9 não apresentou atividade detectável. Também estas mesmas amostras apresentaram percentuais de proteínas abaixo dos encontrados para as amostras de farinha.

Nenhuma das amostras comercializadas como faseolamina apresentou percentuais de proteínas ou atividade de inibição de amilase em valores superiores aos apresentados pelas farinhas, como se esperava. Como anteriormente descrito, “faseolamina” seria a denominação para a fração protéica dos grãos de feijão branco responsável pela inibição da α -amilase digestiva. A comercialização de um produto sob tal denominação poderia induzir à ideia da obtenção de um produto composto por isolado protéico, e, portanto, de alta concentração de proteínas, o que não foi observado para nenhuma das amostras aqui estudadas (Tabela 2). Ainda poderia-se esperar que, de acordo com o originalmente proposto e discutido por Chokshi⁵, os produtos comercializados como “faseolamina” fossem então sinônimo de farinhas de feijão branco que sofreram tratamento térmico controlado, ou seja, produtos com alta atividade de inibição de amilase, comparável às farinhas originárias do produto, mas com ausente atividade de outros compostos tóxicos, como os inibidores de proteases, o que tampouco foi verdadeiro para as amostras comerciais de “faseolamina” analisadas. Apenas as amostras 2 e 7 poderiam estar mais próximas a este conceito, uma vez que manteve atividade de inibição de α -amilase próxima àquela da farinha de feijão branco preparada, mas, ainda que com a redução da atividade de inibição da tripsina, esta também continuou presente nesta amostra (Tabela 1). Porém na amostra 7, ao observarmos sua diluída concentração de proteínas (Tabela 2) em comparação à amostra 12, não parece ser

composta de material advindo somente de farinha de feijão branco. Vale lembrar, que ainda que a amostra seja comercializada como “farinha de feijão branco”, como a 11, esta deveria garantir a inativação dos inibidores de proteases, o que não se verifica pelos dados da Tabela 1.

A amostra 9, particularmente, além de comercializada como “faseolamina” e, de acordo com informações do fabricante, ser um “extrato isolado de feijão branco”, o que sugere claramente uma forma isolada e que deveria, portanto, apresentar alta atividade de inibição de amilase, ao contrário do esperado, não foi encontrada nenhuma atividade inibitória detectável (Tabela 1). A amostra 1, embora se apresentou sob a denominação de “faseolamina”, tinha concentração de proteínas e atividades de inibidores que se assemelhavam à amostra 12, sugerindo que poderiam ser diretamente uma amostra de farinha de feijão branco sendo comercializada. Pires et al³⁰, ao estudarem a composição dos diferentes tipos de feijão, observaram valores próximos aos encontrados neste trabalho, apresentando dados que variaram entre 21,97 e 25,93 % de proteína. Embora a amostra 2 tenha apresentado valores menores de UIT, seus demais resultados também sugerem que seja farinha de feijão branco. Os baixos teores de proteínas das amostras, em especial das amostras 4 a 6 e 8 a 10 (Tabela 1), levantam dúvidas sobre a qualidade destes produtos comercializados. Estas amostras apresentaram resultados que sugerem baixa eficiência para sua proposta de inibição de absorção de carboidratos, de acordo com suas baixas atividades de inibição de α -amilase, mas apresentam atividade de inibidores de tripsina, sugerindo concomitantemente risco associado a seu consumo em função desta exposição diária a inibidores de proteases.

DISCUSSÃO

Embora os resultados de inibição de tripsina aqui encontrados não sejam tão altos quanto os observados para leguminosas como a soja, estes resultados se aproximam dos encontrados em outros trabalhos e que apontam para a correlação positiva entre a atividade de inibição tripsina (UIT) nas dietas e desenvolvimento de patologias em animais. Em um estudo com ratos que foram alimentados por 14 dias com dieta à base de grão de bico não tratado termicamente, leguminosa esta também com baixo nível de UIT, observou-se o desenvolvimento de aumento do peso dos pâncreas (cerca de 47 % de aumento, em relação aos animais alimentados com dieta à base da

mesma farinha tratada termicamente) o que indicava o surgimento de hiperplasia e/ou hipertrofia dos órgãos³¹. De acordo com o observado no citado trabalho, os animais haviam consumido dieta com cerca de 3.000 UIT/g, ou seja, supõe-se que as amostras da farinha de feijão branco cru, por apresentarem quantidades superiores de UIT/g amostra (Tabela 1), também poderiam elevar o risco de aumento na produção da tripsina e, conseqüentemente, alteração do órgão como o observado para os animais, e mesmo as amostras de “faseolamina” aqui estudadas, que apresentaram em média 50 % desta atividade de inibição de tripsina, devem ser consideradas com grande atenção.

Como anteriormente já citado, a ingestão, em especial de maneira prolongada³², deste tipo de composto, poderia alimentar o sistema de *feedback* referente à ação da colecistoquinina, desencadeando uma hiperestimulação da atividade pancreática, associada ao desenvolvimento de hiperplasia e hipertrofia das células do pâncreas. Estudos apontam que este tipo de fenômeno, quando ocorrido em pessoas com alterações iniciais das células acinares, poderia contribuir para a aceleração de processos de desenvolvimento de câncer pancreático^{13,33,34}.

Os mecanismos de indução da hiperplasia e hipertrofia pancreática começaram a ser esclarecidos a partir de 1972, quando Green e Lyman³⁵ demonstraram que a remoção do suco pancreático e bile do intestino causava aumento na secreção de enzimas digestivas, o que era revertido quando tripsina e quimotripsina eram injetadas por canulação diretamente no duodeno. Desde então diferentes hipóteses foram levantadas para a explicação do mecanismo de resposta e regulação da secreção pancreática. Um dos mecanismos mais discutidos é aquele que envolve a regulação do *feedback* da secreção pancreática das enzimas digestivas pela ação da colecistoquinina (CKK), um hormônio ao qual se atribui a mediação desta secreção pancreática, além de apresentar envolvimento em outras funções, como a motilidade gástrica e produção da sensação de saciedade, embora muitas dúvidas ainda parem sobre como exatamente esta regulação ocorre e quais os fatores que a influenciam³⁶⁻³⁹. Diversos estudos convergem em demonstrar alguns pontos destas vias, cujo esquema geral foi representado na Figura 1.

A colecistoquinina, presente nas células endócrinas proximais do intestino delgado, é liberada no sangue assim que há estímulo pela chegada de componentes da dieta ou quando recebem um sinal de que a atividade de tripsina e/ou quimotripsina estão

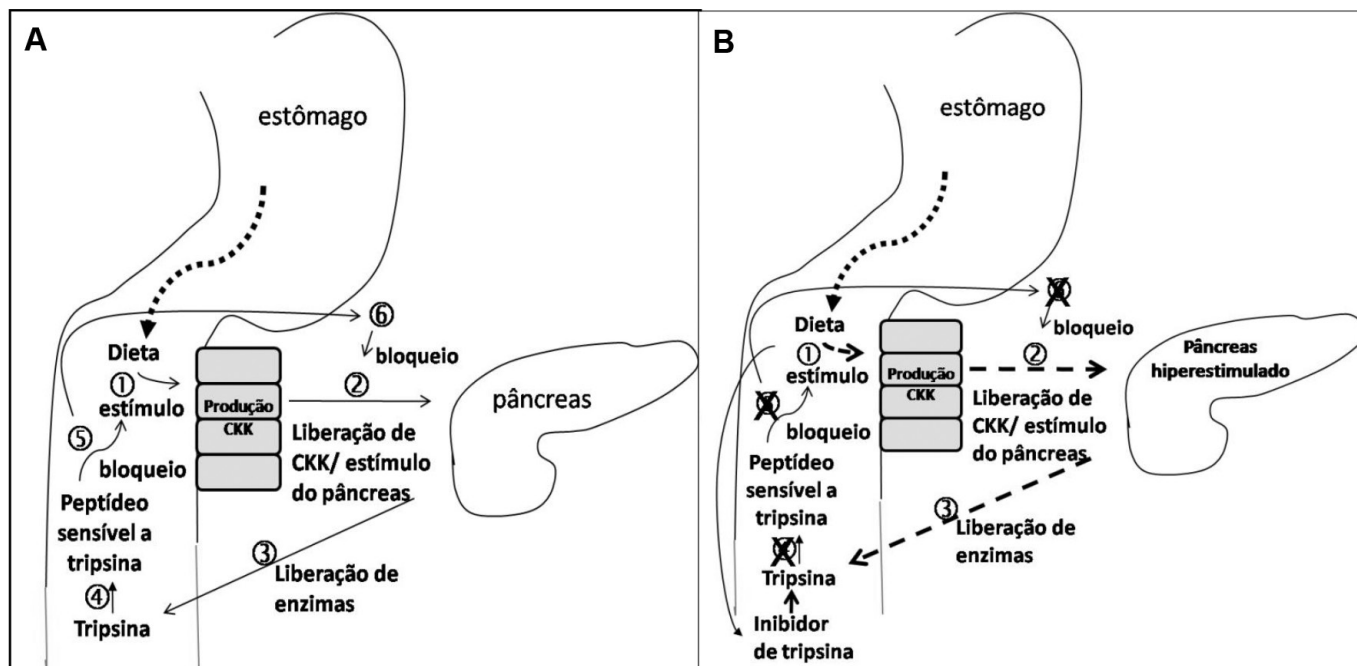


Figura 1. Esquema de produção de hiperestímulo pancreático através da presença de inibidores de tripsina na dieta. A) Mecanismo fisiológico normal de estímulo pancreático (1-Sinal de produção de colecistoquinina (CKK) pela proteína da dieta, 2- Liberação de CKK, 3- Liberação de tripsina, 4- Alta concentração de tripsina na luz intestinal liberando peptídeos bloqueadores, 5- Peptídeos inibindo o sinal de produção de CKK e 6- bloqueio da liberação de CKK e do estímulo de produção pancreática de tripsina); B) Mecanismo fisiológico alterado pela ingestão de inibidores de tripsina, onde as etapas 4, 5 e 6 ficam anuladas, e o bloqueio do estímulo de produção enzimática não ocorre, provocando estimulação constante e hiperprodução pancreática

diminuindo no lúmen intestinal e ainda há proteínas da dieta a serem digeridas^{37,38}. Embora ainda carente de alguns esclarecimentos, esta sinalização acredita-se ser realizada por um peptídeo sensível à tripsina, que seria o responsável por transformar esta queda na concentração de tripsina e quimotripsina em um sinal que regulasse a liberação de CKK. Uma vez que haja liberação de CKK no sangue, e por haverem receptores de membrana para CKK nas células acinares do pâncreas, este então é estimulado a produzir e secretar mais suco pancreático, contendo então a tripsina entre seus componentes enzimáticos. O novo aumento da atividade de tripsina no lúmen intestinal acaba então por exercer um *feedback* negativo na liberação de CKK, que diminui, até que nova redução na concentração de tripsina volte a lhe estimular³⁷⁻⁴⁰.

A partir da compreensão deste mecanismo pode-se então supor que todo fenômeno que cause a redução da atividade de tripsina no lúmen intestinal durante processos de digestão pode levar a uma super estimulação da produção de CKK e, conseqüentemente, uma super estimulação pancreática, que seria responsável

pelo surgimento de hiperplasia/hipertrofia pancreática na ocasião da ingestão continuada de dietas contendo inibidores de tripsina em sua composição^{16,34}.

A carcinogênese pancreática se inicia com o surgimento de células acinares atípicas⁴¹. Estudos realizados com modelos animais, em que ratos tiveram a indução inicial de câncer quimicamente com azaserina, demonstram que aqueles animais que recebiam dietas a base de soja crua apresentavam aumento de tamanho e número destas células muito mais acelerado do que aqueles que não recebiam a dieta¹⁶. Desta forma, sugere-se uma associação entre o desenvolvimento de hiperplasia e/ou hipertrofia pancreática e aumento de risco de câncer de pâncreas.

Alguns autores chamam a atenção ao relatarem que em ensaios realizados com a tripsina humana foi encontrada uma menor atividade de inibição do que aquelas observadas para tripsinas de outras espécies^{10,42}. Em ensaio realizado por Nit e Plahar⁴³, por exemplo, com feijão do tipo Caupi, observou-se que o extrato bruto da amostra inibiu significativamente mais a tripsina bovina, quando comparada sua atividade com a tripsina humana,

mas, houve inibição de cerca de 45 %, o que indica riscos do consumo por parte de seres humanos destes produtos não processados termicamente.

Quantidades de inibidores de proteases seguras para o consumo humano ainda não foram estabelecidas. Neste trabalho, cada cápsula comercializada continha em média 500 mg de produto, e a recomendação de consumo era equivalente a 1 cápsula por grande refeição (almoço e jantar), ou seja, em média 2 cápsulas por dia (cerca de 1 grama de produto, segundo as informações de rótulos), o que acaba por expor o indivíduo a quantidades não controladas e que poderiam significar risco à saúde. Estes dados sugerem uma necessidade urgente de discussão sobre o consumo não controlado de tais produtos e que se estabeleçam níveis seguros para o consumo.

CONCLUSÃO

Foi possível observar neste estudo, a presença de atividade de inibição de tripsina em todas as amostras comercializadas como "faseolamina" e "farinha de feijão branco". Os baixos resultados de atividade de inibição de amilase e teores de proteínas nas amostras estudadas colocam em dúvida a qualidade e a eficiência destes produtos. Considerando que até o momento não existem trabalhos que estabeleçam níveis seguros de consumo destes compostos para o ser humano, e, diante dos citados relatos na literatura que associam a ingestão prolongada destes inibidores com alterações da atividade pancreática, levando assim ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer pancreático, concluímos que o consumo destes tipos de "bloqueadores de carboidratos" deveriam ser bem mais ponderados e fiscalizados pelos órgãos competentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes, pela disponibilização de recursos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica/ICBN/UFTM e a Christopher Mosley pela revisão dos textos em inglês.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira VA, Magalhães, R. Obesidade no Brasil: tendências atuais. *Rev Port Saúde Publ*. 2006; 24(2):71-81.
2. Ryan DH, Kushner R. The State of Obesity and Obesity Research. *JAMA*. 2010;304(16):1835-6.
3. Steyer TE, Ables A. Complementary and alternative therapies for weight loss. *Prim Care Clin Office Pract*. 2009; 36: 395-406.
4. Udani JK, Singh BB, Barrett ML, Preuss HG. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. *Nutr J*. 2009;8(52):1-5.
5. Chokshi D. Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:32-40.
6. Marshall JJ, Lauda CM. Purification and Properties of Phaseolamin, an Inhibitor of α -Amylase, from the Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Biol Chem*.1975;250(20):8030-7.
7. Carlson GL, Li BUK, Bass P, Olsen WA. A Bean α -Amylase Inhibitor Formulation (Starch Blocker) Is Ineffective in Man. *Science*.1983;219:393-5.
8. Liener, IE. Toxic constituents of plants foods. 2ª ed. New York: Academic Press; 1980.
9. Liener IE, Donatucci DA, Tarcza JC. Starch blockers: a potential source of trypsin inhibitors and lectin. *Am J Clin Nutr*.1984; 39:196-200.
10. Deglaire A, Moughan PJ, Bos C, Tome D. Commercial Phaseolus vulgaris Extract (Starch Stopper) Increases Ileal Endogenous Amino Acid and Crude Protein Losses in the Growing Rat. *J Agric Food Chem*.2006;54:5197-202.
11. Holm H, Krogdahl A, Hansen LE. High and Low Inhibitor Soybean Meals Affect Human Duodenal Proteinase Activity Differently: In Vitro Comparison of Proteinase Inhibition. *J Nutr*.1998;118:521-5.
12. Reseland JE, Holm H, Jacobsen MB, Jenssen TG, Hanssen LE. Proteinase inhibitors induce selective stimulation of human trypsin and chymotrypsin secretion. *J Nutr*.1996;126(3):634-42.
13. Liener IE. Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. *J Nutr*.1995;125(3):S:744-9.
14. Liener IE. Soybean protease inhibitors and pancreatic carcinogenesis. *J Nutr*.1996;126(2):582-3.
15. Liener IE. Trypsin inhibitors: concern of human nutrition or not? *J Nutr*.1986; 116(5):920-3.
16. Roebuck BD. Trypsin inhibitors: potential concern for humans?. *J Nutr*.1987;117(2):398-400.
17. Friess H, Kleeff J, Isenmann R, Malfertheiner P, Büchler MW. Adaptation of the Human Pancreas to Inhibition of Luminal Proteolytic Activity. *Gastroenterol*.1998;115(2):388-96.
18. Durigan JF, Sgarbieri, VC, Bulisani EA. Protein value of dry bean cultivars; factors interfering with biological utilization. *J Agric Food Chem*.1987;2(35):694-8.
19. Silva MR, Silva MAAP. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Rev Nutr*.2000;13(1):3-9.
20. Al-Wesali M, Lambert N, Welham T, Domoney C. The influence of pea seed trypsin inhibitors on the in vitro digestibility of casein. *J Sci Food Agric*.1995;68(4):431-7.
21. Antunes PL, Sgarbieri VC. Effect of heat treatment on the toxicity value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. *J Agric Food Chem*.1980;28(5):935-8.
22. Egbe IA, Akinyele IO. Effect of cooking on the antinutritional factors of lima beans (*Phaseolus lunatus*). *Food Chem*.1990;35:81-7.
23. Khattab RY, Arntfield SD. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *Food Sci Technol*.2009;42:1113-8.

24. Mulimani VH, Paramjyothi S. Effect of heat and u.v. on trypsin and chymotrypsin inhibitor activities in redgram (*Cajanus cajan* NCAL.). *J Food Sci Technol*.1993;30(1):62-3.
25. Shimelis EA, Rakshit SK. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East África. *Food Chem*.2007;103:161-72.
26. Wang N, Hatcher DW, Tyler RT, Toews R, Gawalko EJ. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Res Int*.2010;43:589-94.
27. Kakade ML, Rackis JJ, Mcghee JE, Puski G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Am Assoc Cereal Chem*.1974;51:376-82.
28. Mosca M, Boniglia C, Carrat B, Giammarioli S, Nera V, Sanzini E. Determination of α -amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. *Anal Chim Acta*.2008;617:192-5.
29. Association of Analytical Communities - AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Arlington, VA, 1990
30. Pires CV, Oliveira MGA, Cruz GADR, Mendes FQ, Rezende ST, Moreira MA. Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Alim Nutr*.2005;16(2):157-62.
31. Tavano OL, Silva Junior SI, Demonte A, Neves VA. Pancreatic hypertrophy in rats caused by chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein intake. *Alim Nutr*.2005;16(1):5-10.
32. Gumbmann MR, Dugan GM, Spangler WL, Baker EC, Rackis JJ. Pancreatic response in rats and mice to trypsin inhibitors from soy and potato after short- and long-term dietary exposure. *J Nutr*.1989;119(11):1598-607.
33. Mills PK, Beeson WL, Abbey DE, Fraser GE, Phillips RL. Dietary Habits and Past Medical History as Related to Fatal Pancreas Cancer Risk Among Adventists. *Cancer*.1988;61:2578-85.
34. Roebuck BD, Kaplita PV, Edwards BR, Praissman M. Effects of Dietary Fats and Soybean Protein on Azaserine-induced Pancreatic Carcinogenesis and Plasma Cholecystokinin in the Rat. *Cancer Res*.1987;1(47):1333-8.
35. Green GM, Lyman RL. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin induced hypersecretion in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*.1972;140:6-12.
36. Fushiki T, Iwai K. Two hypotheses on the feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. *Faseb J*.1989;3:121-6.
37. Gride JR. Role of Cholecystokinin in the Regulation of Gastrointestinal Motility. *J Nutr*.1994;124(8):S:1334-9.
38. Owyang C. Negative Feedback Control of Exocrine Pancreatic Secretion: Role of Cholecystokinin and Cholinergic Pathway. *J Nutr*.1994;124(8):S:1321-6.
39. Reidelberger RD. Cholecystokinin and Control of Food Intake. *J Nutr*.1994;124(8):S:1327-33.
40. Liddle RA. Regulation of Cholecystokinin Synthesis and Secretion in Rat Intestine. *J Nutr*.1994;124(8):S:1308-14.
41. Shrikhande SV, Barreto G, Koliopanos A. Pancreatic carcinogenesis: The impact of chronic pancreatitis and its clinical relevance. *Indian J Cancer*.2009;46(4):288-96.
42. Weder JK, Kahleyss R. Reaction of lentil trypsin-chymotrypsin inhibitors with human and bovine proteinases. *J Agric Food Chem*.2003;51(27):8045-50.
43. Nit, CA, Plahar WA. Cowpea Inhibition of human and bovine protease activities and the effects of processing. *Food Control*.1996;7(3):129-33.

Pesquisa de fungos produtores de ocratoxina A em granola comercializada

Ochratoxin A-producing fungi in commercial granola

RIALA6/1565

Marta Rejane Ribeiro dos SANTOS^{1*}, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO², Vânia Batista de Sousa LIMA², Antônio William Barbosa de SOUSA³, Mikaela Lopes de CALDAS⁴, Maria Christina Sanches MURATORI⁵

*Endereço para correspondência: ¹Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus da Socopo, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos, CEP: 64049-550 Teresina, PI, Brasil, E-mail: marta.estrela@ig.com.br

²Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

³Médico veterinário autônomo.

⁴Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

⁵Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

Recebido: 08.04.2013 - Aceito para publicação: 26.08.2013

RESUMO

Este trabalho efetuou a identificação das espécies fúngicas presentes na granola e analisou a capacidade das cepas produzirem ocratoxina A. As amostras foram adquiridas no comércio do município de Teresina-Piauí, no total de 60 amostras de quatro diferentes marcas. Foram realizadas as metodologias de contagem, isolamento e identificação das espécies fúngicas; e as cepas da seção *Nigri* foram testadas quanto à capacidade de produção de ocratoxina A. Em 11 das amostras analisadas não houve o crescimento fúngico, e nas amostras em que houve os valores chegaram a 5,17 log₁₀ UFC/g. Houve diferença significativa (p < 0,05) entre as diferentes marcas de granola analisadas. Os gêneros fúngicos mais frequentemente isolados foram *Cladosporium* (46,9 %), seguido de *Aspergillus* spp. e seus teleomorfos (37,4 %), e do gênero *Penicillium* spp. (5,4 %). A amostra de granola da marca A apresentou contagens bem mais elevadas do que as demais, o que indica que possivelmente tenha ocorrido falhas em alguma(s) etapa(s) do processo de industrialização. Todas as cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Nigri* não apresentaram capacidade de produção de ocratoxina A.

Palavras-chave. *Aspergillus*, aveia, cereal, micotoxinas, milho.

ABSTRACT

The present study aimed at identifying the fungal species occurring in granola, and to verify the ability of the strains in producing ochratoxin A. Sixty granola samples of four different brands were purchased in commercial establishments located in the city of Teresina - Piauí state. The fungi were counted, isolated and the species were identified, and the section *Nigri* strains were tested for detecting their ability in producing ochratoxin A. No fungal growth was found in 11 of the analyzed samples. In samples showing fungal growth, it was as high as 5.17 log₁₀ CFU/g. A significant difference (p<0.05) among the analyzed granola brands was found. The most frequently isolated fungus genus was *Cladosporium* (46.9 %), followed by *Aspergillus* spp and its teleomorphs (37.4 %), and *Penicillium* spp. (5.4 %). The granola brand A showed the highest counting among the analyzed brands, which demonstrated that a possible failure at some stages of the industrialization process might be occurred. None of the isolated *Aspergillus* section *Nigri* strains showed the ability in producing ochratoxin A.

Keywords: *Aspergillus*, oatmeal, cereal, mycotoxins, corn.

INTRODUÇÃO

Alimentos com propriedades funcionais, como a granola, vêm a cada dia ganhando espaço nos supermercados. A granola é um composto alimentar rico em fibras, formado pela mistura de grãos de cereais, frutas secas, linhaça, trigo, flocos de milho e de arroz, sementes oleaginosas, como o amendoim e a castanha-do-pará. Além das propriedades nutricionais, é um alimento de excelente sabor, elevado valor energético e vem apresentando crescente consumo^{1,2}.

Micro-organismos são indesejáveis nos alimentos, principalmente fungos, porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os mesmos, provocam sua deterioração. Os fungos têm sido evidenciados como micro-organismos de grande importância para os alimentos. Estes têm sido responsáveis por perdas econômicas de relevância, o que representa uma série de prejuízos em todo o mundo^{3,4}, devido a deterioração dos alimentos e a capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários com potencial tóxico para o homem e os animais, depois de ingeridos⁵.

Existem mais de 100 espécies fúngicas produtoras de micotoxinas, que podem produzir mais de 400 diferentes tipos de micotoxinas, sendo que dessas mais de 250 já tiveram sua estrutura química definida. Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*, dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são considerados os de maior importância para alimentos, por produzirem uma maior variedade e quantidade de micotoxinas^{4,6}.

As ocratoxinas são uma das principais micotoxinas encontradas em alimentos, naturalmente produzidas por fungos das espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium verrucosum*. Existem sete tipos de ocratoxinas, sendo a ocratoxina A (OTA) o metabólito primário mais abundante e tóxico dentre as ocratoxinas encontradas na natureza^{7,8}. É classificada pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) como um agente possivelmente carcinogênico para humanos⁹. As ocratoxinas têm sido encontradas em diferentes tipos de alimentos, incluindo o trigo, milho, café, cacau, cevada, cerveja, figos secos, centeio, queijo, pão, uvas, feijão seco, grãos de soja, frutas cítricas, castanhas do Brasil, tabaco mofado, presunto curado, amendoins e demais produtos similares^{8,10}.

Atualmente trabalhos envolvendo a qualidade de produtos naturais são escassos, tendo em vista isso, esse trabalho objetivou identificar as espécies fúngicas presentes na granola comercializada em Teresina, Piauí, Brasil e verificar a capacidade das cepas de produzirem OTA.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de granola foram adquiridas no comércio do município de Teresina-Piauí, coletadas de forma aleatória, totalizando sessenta (60) amostras de quatro (4) diferentes marcas, correspondendo a um total de 15 amostras por marca (designadas pelas letras A, B, C e D). As mesmas estavam lacradas e dentro do prazo de validade, acondicionadas em prateleiras, à temperatura ambiente do local. O período da coleta foi de novembro de 2010 a março de 2011. Após a coleta elas foram encaminhadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), do Centro de Ciências Agrárias, pertencente à Universidade Federal do Piauí, para a realização das análises.

Contagem de fungos filamentosos e leveduras

As amostras foram trituradas em liquidificador e de cada uma foram retirados e pesados asepticamente 25 gramas de granola e posteriormente adicionado a 225 mL de água peptonada a 0,1 %, obtendo-se assim uma diluição inicial de 10^{-1} . A partir dessa diluição foram preparadas diluições decimais até 10^{-3} , as quais foram utilizadas para a contagem e o isolamento de fungos.

Para contagem de fungos e leveduras, realizou-se a técnica de semeadura em superfície, em que foi inoculado 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo o Ágar Dichloran Rose Bengal Clorafenicol (DRBC) em duplicata. Com o auxílio de alça de Drigalski, foi espalhado o inóculo por toda a superfície do meio, até sua completa absorção, e incubou-se por sete dias à temperatura de 25 °C. Após esse período, foram selecionadas as placas que apresentarem contagem entre 10 a 100 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), conforme Dalcerro et al¹¹.

Isolamento e identificação da microbiota fúngica

Após as contagens das colônias, foi realizada a visualização microscópica para a identificação dos gêneros fúngicos. As colônias fúngicas pertencentes

ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por Klich e Pitt¹², baseadas na semeadura em quatro meios básicos: Czapek yeast extract agar (CYA); malt extract agar (MEA); Czapek yeast extract agar 20 % sucrose (CY20S) e Agar 25 % Glicerol Nitrate (G25N). Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2 % de agar-agar e 0,05 % de Tween 80TM, distribuído em microtubos tipo *ependorf* previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos¹³. A seguir, foi introduzida a agulha de platina na suspensão de conídios, e foram inoculadas em três pontos equidistantes nas placas contendo CYA, MEA, CY20S e G25N. Estas placas foram incubadas por sete dias a 25 °C.

Produção de Ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus* da seção *Nigri*

Todas as cepas de *Aspergillus* seção *Nigri* isoladas das amostras foram testadas para produção de OTA. Utilizou-se a metodologia descrita por Bragulat et al¹⁴. As cepas foram cultivadas em agar Czapeck extrato de levedura (CYA) a 28 °C por 7 dias. Três pedaços do agar foram retirados da área central da colônia, pesados e introduzidos em um pequeno frasco. Um volume de metanol (1000 µL) foi adicionado a cada frasco, a mistura de amostras de solvente foi centrifugada por 10 min a 10000 rpm, e o sobrenadante foi filtrado e evaporado até à secura sob N₂. O resíduo foi redissolvido em metanol e os extratos analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). O eluente foi tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico (70:50:50:10).

Duas soluções de trabalho foram utilizadas, conforme as necessidades dos procedimentos, nas concentrações de 4,0 µg/mL e 0,4 µg/mL. Para fins de cálculo e verificação de linearidade do método empregado uma curva padrão de 7 pontos foi feita contendo concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/L.

Após a eluição dos solventes a placa foi retirada e seca para observação sob luz UV, com comprimento de onda 333 nm.

Análise estatística

Os resultados das contagens foram transformados em log₁₀, correlacionados e realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de média de acordo com os procedimentos do pacote estatístico Sigma Stat¹⁵ ao nível de significância de 5,0 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos existentes na literatura a respeito da microbiota toxígena da granola são escassos.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das contagens de fungos filamentosos e leveduras isolados de quatro marcas de granolas comercializadas em Teresina, Piauí.

Tabela 1. Média das contagens de fungos filamentosos e leveduras, isolados das granolas comercializadas em Teresina, Piauí

Marcas	Médias das contagens fúngicas (log ₁₀ UFC/g)	Desvio padrão	Variação
A (n=15)	4,87 ^a	0,79	2,91 – 5,37
B (n=15)	2,45 ^b	0,49	1,69 – 3,47
C (n=15)	0,88 ^c	1,04	0 – 2,70
D (n=15)	1,86 ^c	1,09	0 – 3,17

UFC/g= unidade formadora de colônias por grama; (P=<0,001); n= amostras; letras iguais não diferem estatisticamente

A contagem fúngica foi feita por meio de enumeração de propágulos fúngicos e as médias foram expressas por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada em log₁₀ UFC/g (Tabela 1). Das 60 amostras pesquisadas, em 11 (18,3 %) delas não houve o crescimento fúngico, sendo que essas eram oriundas das marcas C (8 amostras, 13,3 %) e D (3 amostras, 5 %). Já nas amostras em que houve crescimento fúngico, esses valores chegaram a 5,17 em log₁₀ UFC/g. Houve diferença significativa a (p < 0,05) entre as diferentes marcas de granola analisadas. Sendo que a amostra do grupo A apresentou o maior número de colônias fúngicas (4,87 log₁₀), tendo sido considerada a mais contaminada, seguida pelo grupo B. As que apresentaram a menor média de contaminação foram as dos grupos C e D, que não diferiram significativamente.

A resolução RDC nº 12/2001 não faz referência à contagem de fungos e leveduras em granola¹⁶. A comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa foi feita com base nos limites máximos de bolores e leveduras estabelecidos pela legislação brasileira para produtos considerados semelhantes, como é o caso do grupo das farinhas, massas alimentícias, produtos de panificação (industrializados e embalados) e similares, também não possuem referência quanto à contagem de fungos e leveduras. Embora esse tipo de produto não seja contemplado na legislação, sabe-se que a presença de fungos nos alimentos leva a modificações nas

características organolépticas, levando a uma significativa diminuição da qualidade. Além disso, os fungos podem produzir micotoxinas e causar diversos problemas à saúde dos homens e animais¹⁷.

A Tabela 2 mostra a ocorrência de fungos filamentosos isolados da granola adquiridas em estabelecimentos comerciais de Teresina, Piauí. Todas as marcas analisadas apresentaram contaminação por diferentes gêneros fúngicos, sendo que nem todas as amostras apresentaram desenvolvimento de bolores e leveduras; a literatura cita que algumas dessas cepas podem ser potencialmente capazes de produzir micotoxinas, o que pode representar um risco potencial para a saúde humana¹³. Foram isoladas 147 colônias fúngicas, pertencentes a 9 gêneros fúngicos. Os gêneros mais frequentemente isolados foram: *Cladosporium* spp. (46,9 %), *Aspergillus* spp. e seus teleomorfos (37,4 %), e *Penicillium* spp. (5,4 %). Outros gêneros foram encontrados, porém com uma frequência de isolamento menor.

Tabela 2. Frequência Absoluta e Frequência Relativa (%) dos gêneros fúngicos isolados das amostras de granolas comercializadas em Teresina-Piauí, no período de novembro de 2010 a março de 2011

Gêneros Fúngicos	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
<i>Cladosporium</i>	69	46,9
<i>Aspergillus</i> e seus teleomorfos	55	37,4
<i>Penicillium</i>	08	5,4
<i>Absidia</i>	04	2,7
<i>Botrytis</i>	03	2,0
<i>Fusarium</i>	03	2,0
<i>Curvularia</i>	02	1,4
<i>Mucor</i>	02	1,4
<i>Stachybotrys</i>	01	0,7
Total	147	100,0

Em trabalho realizado por Vecchia e Castilhos-Fortes², foram analisadas amostras de granola comercializadas a granel, e verificado o crescimento de vários gêneros fúngicos como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*. Tais resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, uma vez que confirmam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como uns dos mais frequentemente isolados em amostras de granola (Tabela 2).

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* merece atenção cautelosa, pois é sabido que algumas espécies desse gênero são capazes de produzir aflatoxinas e são comumente encontradas em amendoim, sementes e grãos¹². Como a granola é composta por cereais, pode-se

dizer que os resultados encontrados quanto à presença de *Aspergillus* estão de acordo com a citação acima.

De acordo com Ribeiro et al¹⁸, o gênero *Aspergillus* é considerado como o principal deteriorador de sementes e grãos, causando danos, descoloração e alterações nutricionais, bem como a produção de micotoxinas, que são produtos tóxicos do metabolismo secundário, e atualmente representam um risco de contaminação ambiental, acarretando sérios prejuízos à saúde humana.

Embora o gênero *Cladosporium* tenha sido o mais isolado dentre os fungos nesse trabalho, é sabido que ele até hoje não é considerado um problema em saúde pública, pelo fato de não produzir micotoxinas e não ser o principal deteriorador de alimentos, quando comparado a outros gêneros. Atualmente, a presença de *Cladosporium* spp. está relacionada com a deterioração de tomates.

Outro gênero fúngico de importância, quando se trata de alimentos, é o *Fusarium*. Os resultados encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos obtidos por Vecchia e Castilho-Fortes², com uma baixa incidência do gênero *Fusarium* nas amostras de granola pesquisadas.

Em pesquisas realizadas com produtos que fazem parte da composição da granola foi possível verificar resultados interessantes, Roigé et al¹⁹ analisando trigo, encontrou os gêneros como os mais frequentes: *Penicillium* (42 %), *Fusarium* (27 %) e *Alternaria* (25 %), resultados diferentes dos encontrados nas amostras de granola, demonstrando que a microbiota presente no trigo, não reflete no produto final granola. Em relação à contaminação natural por fungos na aveia, Rupollo et al²⁰ observou uma maior população de fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, resultados esses semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Os gêneros *Aspergillus* e o *Penicillium*, são fungos de extrema importância uma vez que são considerados os principais produtores de micotoxinas em alimentos. A Tabela 3 mostra a identificação das espécies isoladas desses dois gêneros por marca de granola comercializadas em Teresina, Piauí.

Verificou-se que, dentre as marcas estudadas, a que apresentou a maior diversidade de espécies fúngicas foi a marca A, e que houve a menor variedade foi a marca C. Dentre as marcas, a que apresentou maior crescimento de *Aspergillus* foi a marca A, totalizando 44 cepas.

A redução da contaminação fúngica nos alimentos destinados ao consumo é de essencial importância para

Tabela 3. Identificação das espécies fúngicas de granola comercializadas por marcas em Teresina-Piauí, no período de novembro de 2010 a março de 2011

Espécies fúngicas	Marca			
	A	B	C	D
<i>Aspergillus</i>	FA	FA	FA	FA
<i>A. niger agregados</i>	5	2	-	-
<i>A. carbonarium</i>	2	-	-	-
<i>A. japonicus</i>	10	1	-	-
<i>A. flavus</i>	27	1	1	2
<i>A. tamari</i>	-	1	1	-
<i>A. terreus</i>	-	-	-	1
<i>A. penicillioides</i>	-	-	-	1
Total	44	5	2	4
<i>Penicillium</i>	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	2	-	-	1
<i>P. simplicissimum</i>	2	-	-	-
<i>P. funiculosum</i>	-	1	-	-
<i>P. eslandium</i>	-	1	-	-
<i>P. variable</i>	-	-	-	1
Total	4	2	0	2
Total geral por marcas	48	7	2	6

FA = Frequência Absoluta

evitar as perdas na produção de alimentos e também ao risco sanitário para o homem. Essas condições podem ser conseguidas melhorando o transporte, as condições de armazenamento da matéria-prima, produção e comercialização do produto final.

Todas as cepas identificadas de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram testadas quanto à capacidade de produção de ocratoxina A, porém nenhuma das cepas pesquisadas demonstrou essa capacidade.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a marca A de granola apresentou contagens bem mais elevadas que as demais, demonstrando que possivelmente em alguma(s) etapa(s) do processo de industrialização tenha ocorrido falhas. Foi possível isolar uma variedade de cepas de fungos, porém, nenhuma demonstrou capacidade para produzir ocratoxina A.

REFERÊNCIAS

- Granada G, Rosa V, Zambiasi R, Koetz P. Caracterização de granolas comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):87-91.
- Vecchia AD, Castilhos-Fortes R. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):324-7.
- Dantigny P, Guilmar A, Bensoussan M. Basis of predictive mycology. *Int J Food Microbiol*. 2005; 100:187-96.
- Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Veloso T, Souza LAF, et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. *Ciênc Agrotec*. 2005;29(1):106-12.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(3):497-516.
- Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Res Microbiol* 2004; 155(7): 507-13.
- Magnoli C, Astoreca A, Ponsone L, Combina M, Palácio G, Rosa CAR, et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Lett App Microbiol* 2004;39: 326-34.
- Welke JE, Hoeltz M, Noll IB. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e a ocratoxina A em vinhos. *Ciênc Rural*. 2009;39(8):2567-75.
- International Agency of Reserch on Cancer-IARC. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. 2006; 245-395.
- Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- Dalcerro A, Magnoli C, Chiacchera S, Palacios G, Reynoso M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*. 1997;137(3):179-84.
- Klich MA, Pitt JI. *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. CDIRO, Division of food research Sydney, academic Press; Austrália. 1998
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and spoilage*. 3 ed. London: Blackie academic and Professional; 2009
- Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:139-44.
- Sigma Stat for windows version 1.0. Jandel Corporation. 1994.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.12 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. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/rdc_12]. [Acesso: 2010 ago. 30].
- Council for Agricultural Science and Technology – CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139. 2003.
- Ribeiro SAAL, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Rev Bras Bot*. 2003; 26(2):223-9.
- Roigé MB, Aranguren SM, Riccio MB, Pereyra S, Soraci AL, Tapia MO. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Iberoam Micol*. 2009;26(4):233-7
- Rupollo G, Gutkoski LC, Martins IR, Elias MC. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de microtoxinas em grãos de aveia. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(1):118-25.

Determinação de Cd, Cr e Pb no leite e na alimentação bovina do Brasil

Determination of Cd, Cr and Pb in milk and in cattle feed in Brazil

RIALA6/1566

Ana Caroline Schuck GOMES¹, Cleber Antonio LINDINO^{1*}, Affonso Celso GONÇALVES Jr², Gilmar Divino GOMES²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Estudos em Química Analítica Limpa. Departamento de Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Rua da Faculdade, 645, Jardim Santa Maria, CEP 85903-000, Toledo, PR, Brasil. Fone: 45 3379-7074. E-mail: cleberlindino@yahoo.com.br

²Laboratório de Química Agrícola e Ambiental, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Candido Rondon

Recebido: 19.04.2013 - Aceito para publicação: 20.08.2013

RESUMO

A contaminação do leite é uma das maiores preocupações sanitárias em função de seu grande consumo pela população, e pela enorme extensão do país, o que limita a fiscalização adequada. Apesar de estudos científicos indicarem contaminação do leite com elementos traço tóxicos, não há qualquer estratégia do Estado para detecção e prevenção destes componentes no leite. O presente trabalho investigou a ocorrência de chumbo, cádmio e cromo em amostras de leite *in natura* e em leite processado e com o propósito de identificar possíveis fontes de contaminação. No leite *in natura* e no leite processado houve evidência de contaminação por estes elementos traço, muitas vezes em níveis acima do permitido pela legislação brasileira. A mais provável fonte de contaminação foi o sal mineral utilizado na alimentação bovina.

Palavras-chave. elementos traço tóxicos, alimentação bovina, contaminação, leite.

ABSTRACT

The contamination of milk is one of the major health concerns because it is largely consumed by population, and the huge extension of the country limits the adequate inspection of this product. Although scientific studies have indicated the occurrence of milk contamination with toxic trace elements, no government policy for the detection and prevention of these components has been available. This study aimed at investigating the occurrence of lead, cadmium and chromium in samples of raw milk and processed milk in an attempt to identify the possible sources of contamination. Both the *in natura* raw milk and the processed milk evidenced the contamination with these toxic trace elements, and usually at levels above those permitted by Brazilian legislation. The most probable contamination source was the mineral salt employed for feeding cattle.

Keywords. toxic trace elements, cattle feeding, contamination, milk.

INTRODUÇÃO

O leite é definido como um produto da secreção mamária de mamíferos e é um alimento amplamente consumido principalmente por crianças e, por isso, deve apresentar qualidade para assegurar a saúde da coletividade¹. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA – denomina-se leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas². O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. Este Regulamento também dispõe sobre características de qualidade deste leite e foi parcialmente modificado por seis vezes ao longo dos anos, havendo a necessidade de alteração mais completa devido à sua desatualização, de acordo com documento de revisão em trâmite na Câmara Federal dos Deputados³.

O Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite foi uma iniciativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que teve como missão a melhoria das condições sanitárias deste produto. A versão definitiva das novas normas de produção leiteira foi publicada na Instrução Normativa nº 51 – IN 51/2002, que determinou novos regulamentos técnicos para a produção, identidade e qualidade dos leites tipos A, B, C, cru refrigerado, pasteurizado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel até as indústrias⁴. Os requisitos de qualidade do leite foram estabelecidos, destacando-se o índice de acidez, a densidade, índice de gordura e testes microbiológicos para detectar contaminação. Além destes, também são necessários testes para detecção de mastite, contaminação de coliformes fecais e presença de antibióticos para a determinação da qualidade do leite *in natura*⁵.

Entretanto, o gerenciamento e a comunicação do risco no país têm se baseado muito mais nas consequências advindas da não adequação a exigências internacionais do que propriamente na proteção à saúde da população brasileira⁶.

Contudo, apesar de toda esta legislação, verifica-se que não há uma regulamentação para metais pesados tóxicos que podem ser inseridos na cadeia do leite podendo provocar efeitos danosos a quem o consome, seja em curto, seja em longo prazos.

A expressão “metal pesado” aplica-se aos elementos químicos que têm massa específica maior que 5 g.cm⁻³ ou que possuem número atômico maior que 20⁷. Contudo, Duffus⁸ coloca que é mais adequada a

expressão “elementos traço” para caracterizar metais em pequenas concentrações no ambiente e nos seres vivos.

Os elementos traço constituem uma classe na qual muitos são tóxicos para os seres vivos como o Mercúrio (Hg), o Chumbo (Pb), o Cádmiio (Cd) e o Arsênio (As) e que apresentam riscos ambientais devido ao seu uso intenso, disseminação e toxicidade. Outros elementos traço como Manganês (Mn), Zinco (Zn), Cromo (Cr) e Cobalto (Co), que são essenciais em algumas rotas metabólicas, produzem efeitos tóxicos em concentrações mais elevadas^{9,10}.

A contaminação de elementos traço tóxicos nos seres humanos podem ocorrer por diferentes maneiras, com a ingestão de alimentos e a respiração sendo os principais veículos. Os alimentos podem ser contaminados diretamente na fonte de sua produção, durante seu transporte ou armazenamento ou durante sua manipulação¹¹.

Em 1972, o “Joint Expert Committee on Food Additives” estabeleceu como ingestão semanal tolerada provisória (ISTP) de chumbo o valor de 50 µg.kg⁻¹ de massa corpórea para adultos e 25 µg.kg⁻¹ de massa corpórea para crianças; em 1993, adotou para todas as faixas etárias a ISTP de 25 µg.kg⁻¹ de massa corpórea. No caso do cádmio, em 1988, foi estabelecido o valor de 7 µg.kg⁻¹ de massa corpórea, para a ingestão semanal provisória tolerada, que foi ratificado em 1993¹².

As regulamentações para contaminantes inorgânicos passíveis de investigação e controle no caso do leite são 0,05 mg.kg⁻¹ para o Pb¹³. O Decreto 55871/1965 estabelece os limites máximos tolerados¹⁴ de Cd de 1 mg.L⁻¹ e de Cr de 0,10 mg.L⁻¹. Na Comunidade Europeia admite-se no leite o valor máximo de 0,02 mg.kg⁻¹ para o Pb¹⁵.

O cromo (III) tem sido considerado um microelemento essencial em baixas concentrações, pois evidências mostraram que ele se liga à insulina, responsável pelo transporte de glicose e aminoácidos para o interior das células, resultando em uma melhor regulação dos índices de glicose e utilização máxima do potencial energético¹⁶. O Cromo (VI), resultado da oxidação do cromo (III) em determinadas condições de pH, apresenta facilidade de permeação na membrana celular e, sendo um agente oxidante, pode alterar a constituição das células, inclusive material genético, sendo considerado mutagênico¹⁷.

A principal contaminação por elementos traço tóxicos no leite *in natura* pode ter como fonte os insumos contaminados. Ao ingerir, mesmo que em pequenas quantidades, a rota dos elementos traço tóxicos pode seguir duas direções principais: acumular na carcaça do animal (gordura, ossos, fibras) ou serem eliminados nos dejetos,

havendo aí a possibilidade de contaminação direta do meio ambiente, como meios aquáticos e solos, que introduzem estes elementos em um novo ciclo de contaminação.

Normalmente, a contaminação na alimentação destes animais se dá por rações e suplementos de baixa qualidade ou contaminação por fontes antropogênicas (industriais, por exemplo) próximas ao local de criação.

Cromo tem sido utilizado com micronutriente para o crescimento de animais (carboaminofosfoquelato de cromo), apesar de controvérsia sobre sua efetividade, e cromo, chumbo e cádmio têm sido encontrados como contaminantes em fertilizantes⁷, que comprometem a cadeia alimentar, encontrados em suplementos animais.

Além disso, a presença de Cr e Cd podem ser provenientes de desgastes de equipamentos de processamento de leite. Portanto, estudos para detectar e rastrear estas fontes de contaminações são extremamente importantes para a saúde pública.

Gonçalves et al¹⁸ encontraram em amostras de leite provenientes do estado de Goiás valores médios de 0,238 mg.kg⁻¹ de Pb (excedendo o máximo permitido por lei) e de 0,0482 mg.kg⁻¹ de Cd, com grande amplitude de resultados, mas sendo possível indicar as diferentes contaminações em diferentes mesorregiões.

Em um trabalho em que se analisou leite *in natura* em áreas industrializadas e não industrializadas, detectou-se Pb nas amostras de leite na área industrializada e diferenças significativas ($P < 0,05$) não foram verificadas entre épocas de amostragem (verão e inverno)¹⁹. As concentrações médias e máximas de Pb obtidas na área industrializada foram inferiores ao valor de referência para animais criados em áreas livres de contaminação pelo metal, que é de 0,02 µg.mL⁻¹. Amostras de leite coletadas pelos autores em animais mantidos em áreas contaminadas alcançaram teores de Pb de 1,6 a 1,9 µg.mL⁻¹. Nas amostras estudadas não se detectou o Cd.

Estudos realizados na década de 1980 constataram que a ingestão de 500 mg de chumbo por dia ocasionou um aumento nos níveis de chumbo no leite em média de 0,06 mg.L⁻¹ de Pb. Já a ingestão diária de 40 mg de cádmio não acarretou elevação nos níveis desse metal no leite²⁰.

A extensão de uma contaminação pode ser difícil de ser mensurada, mas é possível inferir sobre sua gravidade. Estudos desenvolvidos recentemente encontraram cádmio no colostro de mães em 58 amostras avaliadas, com valores que oscilavam entre 0,13 e 2904 µg.L⁻¹ de Cd. Os autores não conseguiram explicar a fonte da contaminação, uma vez que as mães estudadas não trabalhavam no comércio

ou em indústrias, nem moravam próximas a metalúrgicas ou fundições²¹. Importante ressaltar a informação de que 51 delas (87,9 %) não fumavam, pois o cigarro é uma fonte de cádmio²².

Em relação aos hábitos alimentares, não havia relato de consumo rotineiro de vinho ou bebida destilada e de peixes. O consumo era restrito para arroz, feijão, carne, aves, legumes cultivados localmente, leite pasteurizado, manteiga, café e pão, presente no cardápio normal dos brasileiros.

Okada et al²³ constataram a contaminação do leite *in natura* e pasteurizado comercializado na região do Vale do Paraíba com o intuito de avaliar o impacto da indústria de lingotes de chumbo instalada na região. Outros pesquisadores promoveram estudos sobre contaminação de elementos traço tóxicos em leite bovino, humano e de cabras²⁴⁻²⁸.

No Brasil, tem-se realizado alguns estudos sobre o tema^{16,17,19,28-30}. Contudo, as pesquisas no Brasil envolvendo a contaminação no leite animal ou humano por elementos traço tóxicos representam apenas 0,95 % na base ISI considerando as palavras-chave “milk and metals”, porcentagem aproximada encontrada também na base Scopus. Na base Scielo somente quatro artigos foram identificados com o tema. Portanto, maiores pesquisas contribuirão com estes estudos.

No caso destes elementos, em particular o Pb, as principais fontes para animais são os insumos utilizados em sua alimentação, sejam industrializados ou alimentos *in natura*³¹. Os autores afirmam que blocos salinos para suplementação mineral são uma das principais fontes de entrada de Pb para a contaminação dos bovinos nos estados do Mato Grosso do Sul e Paraná. Os componentes utilizados para a suplementação de fósforo (P) em rações suínas podem ter Pb como contaminante, com valores variando entre 10,0 e 48,5 mg.kg⁻¹.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a contaminação por Pb, Cr e Cd, em leite *in natura* e leite pasteurizado comercializado na região do Município de Marechal Cândido Rondon – PR, avaliando também as possíveis fontes de contaminação, provenientes da alimentação animal e do processamento do leite pasteurizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes químicos utilizados foram de pureza de grau para análise. A água utilizada para o preparo de soluções padrão ou diluições de amostras foi destilada e purificada por osmose reversa (ADAMO, resistência da água de 5 Mohms.cm⁻¹ a 25 °C).

As amostras de leite bovino *in natura* foram coletadas em sete localidades produtoras (nomeadas como P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7) localizadas nas redondezas do município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, e, para cada produtor, foram realizadas três coletas a cada 15 dias durante o período de julho de 2011 a agosto de 2012, sendo que em cada coleta três amostras foram utilizadas para os estudos, perfazendo um total de 63 amostras.

As amostras de leite foram colhidas nos tanques de resfriamento e armazenamento dos produtores e colocadas em frascos secos, limpos e devidamente tampados, e mantidas em refrigeração ($T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a análise.

As amostras de leite pasteurizado foram adquiridas em comércio localizado no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, no período entre setembro de 2012 e março de 2013, sendo que em cada coleta três marcas (indicadas neste texto como M1, M2 e M3), com três amostras, foram utilizadas para os estudos, em um total de 33 amostras.

Em seguida, processaram-se e analisaram-se as amostras de leite *in natura* e leite processado, utilizando a técnica analítica de espectrofotometria de absorção atômica com chama (equipamento GBC modelo 932), com as seguintes descrições de comprimento de onda, corrente da lâmpada e slit, respectivamente: Cd a 228,8 nm, 3,0 mA e 0,5 nm; Pb a 217,0 nm, 5,0 mA e 1,0 nm; Cr a 357,9 nm, 6,0 mA e 0,2 nm. A digestão³² foi realizada com solução nitroperclórica, diluição em balões volumétricos calibrados. Para a calibração utilizou-se padrões de 1003 mg.L⁻¹, 1005 mg.L⁻¹ e 1000 mg.L⁻¹ de Cd, Cr e Pb, respectivamente, da marca Specscol®. Os resultados da calibração indicaram desvio padrão (DP) de 4,0, 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹; coeficiente de variação (CV %) de 0,399, 0,398 e 0,600 % e limite de quantificação (LQ) de 0,005, 0,010 e 0,010 mg.L⁻¹, respectivamente para Cd, Cr e Pb. As faixas de concentração utilizadas foram para o Cd de 0,2 a 1,8 mg.L⁻¹, para o Pb de 0,5 a 10,0 mg.L⁻¹ e para o Cr de 0,5 a 10,0 mg.L⁻¹. A recuperação nas amostras apresentou resultados entre 93 e 104 % para o Pb, 92 e 105 % para o Cd e 90 a 105 % para o Cr. As amostras foram analisadas em triplicata e calculou-se a média, o DP e o CV % das concentrações de chumbo, cádmio e cromo encontradas.

Também foram realizadas determinações de pH, acidez Dornic e condutividade elétrica no leite *in natura* com os mesmos cuidados de coleta e transporte das amostras. O pH foi determinado por meio de um pH metro LABMETER PHS-3B, calibrado com tampões pH 7,0 ($\pm 0,05$) e pH 4,0 ($\pm 0,02$) e a condutividade elétrica foi determinada por um condutímetro de bancada LUTRON CD-4303, calibrado com solução padrão KCl 146,9 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\pm 0,5\%$). Já a acidez

foi determinada por meio do método de Dornic⁵. Dos resultados, calculou-se a média, o DP e o CV %.

Para a avaliação das fontes de contaminação foram coletadas três amostras da água (1, 2, 3), do sal mineral (1, 2, 3), da ração (1, 2, 3) e da silagem (1, 2, 3) utilizadas pelos produtores que forneceram as amostras de leite, as quais serviam de alimentação para os bovinos. Para comparação, também foram coletadas três amostras de cada um dos alimentos da nutrição bovina (forrageira, sal mineral, farelo de milho e de soja, milho, cana e a água) utilizadas na alimentação do gado bovino pertencente ao Colégio Agrícola de Toledo/PR, para comparação. Amostras de cinco marcas de sal mineral (1, 2, 3, 4, 5) adquiridas no comércio local também foram analisadas e os resultados apresentados representam a média dos resultados em triplicata. As amostras foram acondicionadas em recipientes de plástico transparente, previamente identificados, com 100 gramas de cada tipo de amostra. Todas as amostras sólidas foram pesadas e digeridas em solução nitroperclórica³³ diluídas adequadamente em balões volumétricos calibrados a 25 °C e as medidas de determinação de elementos traço foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica, modalidade chama. As amostras de água foram previamente acidificadas com HCl 1 mol.L⁻¹ (Merck).

Os elementos traço tóxicos foram determinados também em três amostras de marcas nacionais e em uma marca de proveniência chinesa de soda cáustica utilizadas na limpeza dos equipamentos de processamento de leite pasteurizado. As amostras foram diluídas em água purificada e acidificadas com solução HCl 1 mol.L⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a média, DP e CV % dos resultados de nove amostras para a concentração dos elementos traço tóxicos determinados nas amostras de leite *in natura* para cada produtor avaliado.

Os resultados mostram a presença de Pb, Cd e Cr no leite *in natura* em todas as amostras dos produtores P1 e P2, sendo que os valores máximos de chumbo permitidos pela legislação foram excedidos em todas as amostras, menos para o produtor P3. Para as amostras P1, P2 e P3 os valores obtidos estão acima do LQ, mas abaixo dos limites estabelecidos na legislação. Para os produtores P4 a P7 o elemento traço Cd está abaixo do limite de quantificação (0,005 mg.L⁻¹). O Cr excedeu o limite máximo tolerável nos produtores P4 e P7.

Para o leite *in natura*, os valores encontrados para pH (valor médio de 6,67 \pm 0,06) e acidez Dornic (valor

Tabela 1. Concentração de Pb, Cd e Cr, em mg.L⁻¹, nas amostras de leite *in natura*

	Chumbo	Cádmio	Cromo
Produtor 1			
Média	0,260 ± 0,018	0,038 ± 0,004	0,031 ± 0,009
CV (%)	6,89	10,53	29,03
Produtor 2			
Média	0,239 ± 0,010	0,032 ± 0,004	0,007 ± 0,003
CV (%)	4,40	12,50	42,86
Produtor 3			
Média	0,034 ± 0,004	0,022 ± 0,003	nq
CV (%)	11,76	13,64	-
Produtor 4			
Média	0,467 ± 0,306	nq	0,156 ± 0,059
CV (%)	65,46	nq	38,21
Produtor 5			
Média	0,083 ± 0,029	nq	nq
CV (%)	34,69	nq	nq
Produtor 6			
Média	0,083 ± 0,029	nq	0,067 ± 0,029
CV (%)	34,69	nq	43,33
Produtor 7			
Média	0,100	nq	1,667 ± 0,577
CV (%)	-	nq	34,64

nq = abaixo do limite de quantificação

médio de 16,0 ± 0,5 °D) estão de acordo com valores aceit². O valor da condutividade elétrica (valor médio de 5,7 ± 0,6 mS.cm⁻¹) está acima dos valores de referência aceit³⁴. Estes parâmetros não serão úteis para se detectar contaminação com elementos traço tóxicos, pois, alteração do pH e acidez e o valor de condutividade elétrica no leite acima de valores de referência não são apropriados para indicar contaminação destes elementos estudados.

Para investigar as possíveis fontes de contaminação no leite analisaram-se amostras da alimentação animal utilizadas pelos produtores estudados. Não foram detectados elementos traço tóxicos nas amostras de água, silagem e ração, de acordo com os limites de quantificação do método. Os resultados para amostras de três marcas de sal mineral utilizadas pelos produtores podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Teores de chumbo, cádmio e cromo no sal mineral utilizado pelos produtores dos leites *in natura* amostrados

	mg.kg ⁻¹		
	Chumbo	Cádmio	Cromo
Sal Mineral 1	54,67 ± 2,50	5,33 ± 1,00	14,33 ± 3,50
Sal Mineral 2	52,33 ± 2,88	9,00 ± 2,12	46,33 ± 6,36
Sal Mineral 3	8,33 ± 2,12	5,00 ± 1,00	nq

nq = abaixo do limite de quantificação

Os teores de elementos traço tóxicos encontrados no sal mineral foram muito elevados, sendo que os teores de Pb e Cr para as marcas 1 e 2 excederam o limite máximo aceitável pelo National Research Council de 30 mg.kg⁻¹ e 1,0 mg.kg⁻¹, respectivamente³⁵. Os teores de Cd foram excedidos em todas as amostras (limite de 1,0 mg.kg⁻¹) Isto indica que o sal mineral pode ser uma fonte considerável de contaminação do leite *in natura*. Para amostras de sal comum, determinou-se o valor médio de 4 mg.kg⁻¹ de cádmio.

Para a confirmação de resultados de contaminação em sal mineral e sal comum, cinco novas amostras foram coletadas de outras marcas disponíveis no comércio, diferentes das utilizadas pelos produtores da Tabela 3 e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Os teores dos elementos traço tóxicos excederam os valores preconizados pelo National Research Council em todas as amostras de sal mineral, sendo menor em sal comum, mas ainda assim elevado. Esta contaminação foi também observada em sal mineral comercializado em Mato Grosso do Sul, e os autores detectaram níveis de chumbo acima do limite máximo em quase 60 % das amostras³⁶.

De acordo com os autores, a maior suspeita de contaminação recai sobre as fontes de fósforo utilizadas na preparação do sal mineral, pois esta representa o maior custo, induzindo os produtores a buscarem fontes mais baratas. Há a possibilidade de o chumbo estar agregado nas fontes de fósforo naturais ou ao ácido fosfórico importado. A utilização de fontes de origem suspeita ou resíduos industriais deve ser considerada.

Tabela 3. Resultados das amostras de sal mineral disponíveis no comércio utilizadas como suplemento na alimentação animal (mg.kg⁻¹)

	Chumbo	Cádmio	Cromo
Sal mineral 1			
Média	84,0 ± 4,36	6,667 ± 1,155	28,667 ± 1,155
CV (%)	5,19	10,82	4,03
Sal mineral 2			
Média	66,67 ± 4,04	5,333 ± 0,577	49,33 ± 1,155
CV (%)	6,06	10,82	2,34
Sal mineral 3			
Média	64,5 ± 4,23	5,000	25,33 ± 1,155
CV (%)	6,56	0,000	4,56
Sal mineral 4			
Média	64,0 ± 1,0	5,667 ± 0,577	37,33 ± 1,155
CV (%)	1,56	10,19	3,09
Sal mineral 5			
Média	68,33 ± 1,155	6,333 ± 0,577	51,33 ± 2,08
CV (%)	1,69	9,116	4,05
Sal comum			
Média	22,0 ± 2,0	2,667 ± 1,155	1,667 ± 1,155
CV (%)	9,09	43,31	69,27

Contaminação de sal mineral por chumbo também foi verificada em amostras comercializadas em São Paulo e Paraná, em cerca de 30 % dos produtos analisados³⁷.

Os resultados indicam que o sal mineral, utilizado na alimentação bovina, pode ser uma fonte considerável de contaminação do leite *in natura*. Também indicam deficiência ou inexistência de controle de qualidade no processo de fabricação. A possibilidade de adulteração também não está descartada.

Deve-se ressaltar que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio de sua Instrução Normativa nº 12, de 11 de outubro de 2002, determina a classificação, composição e o registro de suplementos minerais para bovinos, estabelecendo níveis mínimos de garantia de macro e micronutrientes, omitindo-se completamente sobre o controle de contaminantes inorgânicos e orgânicos³⁸.

Nas amostras de alimentação animal coletadas no Colégio Agrícola de Toledo, para comparação, detectou-se a presença de chumbo nas amostras de silagem, milho, cana e sal mineralizado e, neste último, os teores encontrados oscilaram entre 39,0 e 54,0 mg.kg⁻¹. Para silagem (pastagem) encontrou-se valores entre 5,0 a 22,0 mg.kg⁻¹, dependendo da área amostrada, indicando contaminações pontuais. O elemento traço Cd foi detectado somente nas amostras de sal mineralizado, com valor médio de 7,5 ± 0,7 mg.kg⁻¹. O elemento traço Cr foi detectado em todas as amostras com teores entre 0,1 a 25 mg.kg⁻¹, com destaque para uma amostra de silagem com teor de 67,0 mg.kg⁻¹.

No caso de forrageiras, coletadas em diferentes áreas, há a presença de contaminação de Cr e de Pb, esta última podendo provir de contaminação externa. Não foram determinados os elementos traço tóxicos na água utilizada pelos animais que estão abaixo do limite de quantificação.

Um estudo interessante na literatura foi a avaliação da fitodisponibilidade de Cd, Pb, e Cr, em cultivo de soja, tratado com fertilizantes comerciais encontrando-se concentrações na parte aérea das plantas de 0,267 mg.kg⁻¹, 5,67 mg.kg⁻¹ e 4,33 mg.kg⁻¹ para Cd, Pb e Cr, respectivamente⁷. A aplicação de fertilizantes com micronutrientes mostrou uma efetiva disponibilização de Cd, Pb e Cr para as plantas de soja. O aumento da dosagem das aplicações dos fertilizantes e dos sais contendo os elementos traço tóxicos aumentou a concentração dos metais nas plantas, em todos os casos.

Na adubação podem ser empregados três insumos que podem conter Cd: adubos fosfatados, os esterco e lodo de esgoto. O uso indiscriminado de adubos

fosfatados, possíveis fontes de elementos traço tóxicos quando provenientes de fontes não seguras, é uma das causas principais de contaminação de alimentos, entre eles os insumos utilizados nas rações, gerando a possível contaminação no leite.

A Tabela 4 apresenta os resultados da concentração dos elementos traço tóxicos determinados nas amostras de leite pasteurizado estudadas, bem como o DP e o CV de tais amostras. O metal Cromo não foi detectado em nenhuma das amostras de acordo com a metodologia adotada.

Os resultados mostram que há contaminação no leite pasteurizado com elementos traço tóxicos Cádmi e Chumbo em todas as amostras das três marcas avaliadas, cuja ingestão contínua pode acarretar danos ao organismo humano em longo prazo, mesmo que os teores estejam abaixo do máximo permitido pela legislação. Ressalta-se que crianças são mais suscetíveis à contaminação pela quantidade ingerida ou pela razão massa corporal/ingestão diária.

A variabilidade observada no CV nas amostras indica contaminação por várias fontes, já que a metodologia de determinação por espectrofotometria atômica tem desvios padrão relativos menores que 1 %.

Tabela 4. Teores médios de cádmio e chumbo, em mg.L⁻¹, nas amostras de leite pasteurizado

	Cd	Pb	Cr
Marca 1			
Média	0,020 ± 0,005	0,306 ± 0,100	nq
CV (%)	25,0	32,68	-
Marca 2			
Média	0,017 ± 0,008	0,257 ± 0,087	0,002 ± 0,002
CV (%)	47,06	33,85	100,0
Marca 3			
Média	0,016 ± 0,007	0,279 ± 0,109	0,002 ± 0,003
CV (%)	43,75	39,07	150,0

nq = abaixo do limite de quantificação

A análise por variância indicou que não há diferença estatisticamente significativa entre as marcas de leite processado para o elemento traço Cd e para o Pb. Também foi possível observar que o DP dentro das amostras foi maior do que o DP entre as amostras, para todos os elementos traço estudados. Estes dois resultados indicam que não há contaminação pontual em uma marca específica, sendo mais ampla e originária da contaminação nas fontes produtoras. Para o Cr, devido ao fato de que em 44,87 % das amostras o teor encontrado foi abaixo do limite de quantificação não se realizou a análise por variância.

A contaminação de elementos traço tóxicos no leite pasteurizado pode ter origem no desgaste ou na corrosão

dos equipamentos utilizados, normalmente constituídos por aço inoxidável (AISI 304 ou AISI 316) e que apresentam revestimentos ou peças como parafusos e soldas passíveis de corrosão e contaminação dos alimentos³⁹.

Outra importante fonte de contaminação no leite pasteurizado pode ser a soda cáustica (hidróxido de sódio) utilizada na limpeza dos tanques da indústria de laticínios, cujos traços podem permanecer no recipiente se houver um controle de processo ineficaz. Os resultados para amostras de soda cáustica de três marcas diferentes (H1, H2 e H3) e de uma amostra do mercado chinês (CH) analisadas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teores de Cd, Pb e Cr na soda cáustica, em mg.kg⁻¹

Amostra	Cd	Pb	Cr
H1	6,15 (8,01)	54,65 (1,10)	19,50 (2,78)
H2	5,85 (8,56)	46,45 (1,34)	16,85 (2,56)
H3	4,55 (9,20)	35,55 (1,39)	16,15 (2,50)
CH	7,33 (7,88)	127,67 (1,20)	1,67 (34,57)

O valor entre parênteses refere-se a CV %

Na Tabela 5 é possível verificar a presença de elementos traço tóxicos na soda cáustica utilizada na lavagem dos tanques, ressaltando-se que os teores de Cd e Pb são mais elevados (valor médio superior em 32,8 % e 80,3 %, respectivamente) nas amostras provenientes do mercado chinês, normalmente comercializada com custo menor.

A legislação brasileira estabelece que o hidróxido de sódio não é permitido para uso em leite, por induzir e mascarar as boas práticas de fabricação⁴⁰. Contudo, é utilizado na limpeza dos equipamentos de processamento e, neste caso, não deve possuir contaminantes em sua composição que possam ser introduzidos no alimento em quantidades que ultrapassem os limites estabelecidos pelo Food Chemical Codex¹².

A presença de substâncias alcalinas no leite pode ser oriunda de fraude intencional, quando se utiliza de substâncias alcalinas para conservar o leite, mas também pode ocorrer devido a falhas no momento da higienização e da sanitização na obtenção do leite ou dentro dos laticínios que utilizam soluções alcalinas na limpeza de equipamentos, utensílios ou mesmo da própria estrutura física para remoção de gordura do leite que possa ficar aderida.

Assim, os dados apresentados neste trabalho mostram que é possível que traços de hidróxido de sódio contendo chumbo contaminem o leite processado, um problema de saúde pública que ainda não foi devidamente explorado.

Um cálculo simples pode ser feito para estimar a quantidade máxima de leite que pode ser ingerida por uma criança de 25 kg (condições normais, em torno de seis anos). Com base em uma média de 0,281 g.L⁻¹ de chumbo no leite processado, uma criança só poderia ingerir 318 mL de leite ao dia, de acordo com o preconizado, para não exceder os limites. Contudo, deve-se ressaltar a característica acumulativa do chumbo no organismo. Para o Cd, na média das concentrações determinadas, o intervalo é maior, podendo-se ingerir até um litro por dia, fazendo-se novamente a ressalva do caráter acumulativo e carcinogênico do Cd. Também é importante destacar que crianças com menores massas terão tolerância menor a estes contaminantes.

Para os seres humanos, a ingestão de Pb e Cd podem alterar o metabolismo interno pois ambos são antagonistas do Ca e do Zn. No caso do cálcio, pode haver substituição deste elemento na estrutura óssea por Pb, acarretando problemas de crescimento em crianças e fragilidade nos ossos.

CONCLUSÃO

Há evidências de contaminação no leite *in natura* e processado por Pb, Cd e Cr, com valores que excedem o preconizado pela legislação vigente. O sal mineral utilizado na alimentação bovina é a principal fonte de contaminação na produção, podendo haver contaminação do leite processado devido à soda cáustica utilizada no processo de limpeza de tanques. Uma política pública de monitoramento da contaminação do leite por estes elementos traço e principalmente nos alimentos de nutrição animal se faz necessário.

REFERÊNCIAS

1. Silver HK, Kempe CH, Bruyn HB. Manual de Pediatria; 10ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1975.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 07 jul 1952.
3. Brasil. Câmara dos Deputados. regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. Nota Técnica. [Acesso 2013 out. 23]. disponível em [http://www2.camara.leg.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes/estnottec/tema2/2011_18455.pdf].
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51. Aprova os regulamentos técnicos, identidade e qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 set 2002. Seção 1, p.13.

5. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. 2ª edição. Santa Maria: Editora da UFSM, 2003.
6. Spisso BF, Nóbrega AW, Marques MAS. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 2009;14(6):2091-106.
7. Gonçalves Jr AC, Luchese EB, Lenzi E. Evaluation of phytoavailability of the cadmium, lead and chromium in soybean cultivated in the latossolo vermelho escuro, treated with commercial fertilizers. *Quím Nova*. 2000;23(2):173-7.
8. Duffus JH. Heavy Metals: a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*. IUPAC – Tech Rep. 2002;74(5):793-807.
9. Gonçalves Jr AC, Selzein C, Nacke H. Uso de biomassa seca e aguapé (*Eichornia crassipes*) visando à remoção de metais pesados tóxicos de soluções contaminadas. *Acta Scient Technol*. 2009;31(1):103-8.
10. Baird C, Cann M. Química Ambiental. 4ª edição, Porto Alegre: Editora Bookman; 2011.
11. Calabrese EJ, Canada AT, Sacco C. Trace Elements and Public Health. *Ann Rev Publ Health*. 1985; 6:131-46.
12. FAO/WHO. Joint Expert Committee on Food Additives, 41ª, Geneva, 1993. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, WHO/IPCS, 1993. (WHO Food Additives Series, 3).
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 685, 27 de agosto de 1998. Aprova o regulamento técnico: “Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos” e seu Anexo: “Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 28 ago 1998, nº 165-E, Seção 1, p.28-29.
14. Brasil. Ministério de Saúde. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 09 abr 1965. Seção 1, p.3612-22.
15. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Regulation 1881/2006. [Acesso 2013 Jan 09] Disponível em [http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals.htm].
16. Montemor CH, Marçal WS. Desempenho de bovinos da raça nelore suplementados com cromo orgânico. *Semina*. 2009; 30(3):701-8.
17. Melked A, Langard S. Incidence of cancer among welders and other workers in a Norwegian shipyard. *Scand J Work Environ Health*. 1989;15:387-94.
18. Gonçalves JR, Mesquita AJ, Gonçalves RM. Determinação de metais pesados em leite integral bovino pasteurizado no estado de Goiás. *Ciênc Anim Bras*. 2008; 9(2): 365-74.
19. Souza MV, Vianna MWS, Zandim BM, Fernandes RBA, Fontes MPF. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. *Ciênc Rural*. 2009;39(6):1774-81.
20. Sharma RP, Street JC, Shupe JL, Bourcier DR. Accumulation and depletion of cadmium and lead in tissues and milk of lactating cows fed small amounts of these metals. *J Dairy Sci*. 1982; 65:972-9.
21. Nascimento LFC, Izário Filho HJ, Pereira ML, Baccan N. Cadmium quantification in Brazilian mother's colostrums: a regional study. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2005;5(2):193-8.
22. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. Ficha de Informação Toxicológica. 2012. [Acesso 2013 feb 01] Disponível em [http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cadmio.pdf].
23. Okada IA, Sakuma AM, Maio, FD, Dovidauskas S, Zenebon O. Avaliação dos níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência de contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1997;31(2):140-3.
24. Gonzalez-Montana JR, Senis E, Gutierrez A, Prieto F. Cadmium and lead in bovine milk in the mining area of the Caudal River (Spain). *Environm Monit Assess*. 2012;184(7):4029-34.
25. Temiz H, Soylu A. Heavy metal concentrations in raw milk collected from different regions of Samsun, Turkey. *Int J Dairy Techn*. 2012;65(4):516-22.
26. Krol J, Litwinczuk Z, Brodziak A, Kedzierska-Matysek M. Content of selected essential and potentially toxic trace elements in milk of cows maintained in eastern Poland. *J Elementol*. 2012;17(4):597-608.
27. Rahimi E. Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran. *Food Chem*. 2013;136(2):389-91.
28. Antakli S, Sarkis N, Hajar AA. Determination of Cd, Pb and Ni in Syrian Cow Milk by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Asian J Chemist*. 2013;25(2):1063-8.
29. Soares VA, Kus MMM, Peixoto ALC, Carrocci JS, Salazar RFS, Izario Filho HJ. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraíba region (Brazil). *Food Control*. 2010;21(1):45-9.
30. de Castro CSP, Arruda AF, Cunha LR, Souza JR, Braga JWB, Dorea JG. Toxic Metals (Pb and Cd) and Their Respective Antagonists (Ca and Zn) in Infant Formulas and milk marketed in Brasília, Brazil. *Int J Environm Res Publ Health*. 2010;7(11): 4062-77.
31. Marçal WS, Gaste L, do Nascimento MR, Oliveira HS. Teores de chumbo em suplementos minerais comercializados no estado de Mato Grosso de Sul. *Ciênc Rural*. 2003; 33(4):775-8.
32. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. 1ª ed. digital. Capítulo XXIII. Minerais e Contaminantes Inorgânicos. 4ª edição, 2008.
33. Association of Official Analytical Chemist - AOAC. Official Methods of Analysis. 18ª edição. Maryland, 2005.
34. González, F. H. D. Composição Bioquímica do Leite e Hormônios da Lactação. In: *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
35. National Research Council. Subcommittee on mineral toxicity in animals. Washington DC: National Academy Science; 1980.
36. Marçal WS, Gaste L, Liboni M, Pardo PE, do Nascimento MR, Hisasi CS. Concentration of lead in mineral salt mixtures used as supplements in cattle food. *Exp Toxic Pathol*. 2001;53:7-9.
37. Marçal WS, Pardo PE, Nascimento MRL, Fortes MS. Inorganic lead concentration in mineral salt commercial mixtures for beef cattle in São Paulo State, Brazil. *Arq Inst Biol*. 2005; 72(3): 339-41.
38. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 12, de 30 de novembro de 2004. Aprova o regulamento técnico sobre fixação de parâmetros e das características mínimas dos suplementos destinados a bovinos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 30 nov 2004. Seção 1, nº 231, p.4-7
39. Teles PCS. Materiais para equipamentos de processo. Rio de Janeiro: Interciência; 2000.
40. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 33, de 25 de outubro de 2007. Hidróxido de Sódio (soda cáustica) – INS 524. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/33_251007.htm]. [Acesso 2013 set 09].

Contaminação parasitária em alfaces crespas (*Lactuca sativa* var. *crispa*), de cultivos tradicional e hidropônico, comercializadas em feiras livres do Rio de Janeiro (RJ)

Parasitological contamination in lettuces (*Lactuca sativa* var. *crispa*), from traditional and hydroponic cultivations, commercialized in free markets of Rio de Janeiro (RJ)

RIALA6/1567

Bruno Barbosa PACIFICO, Otilio Machado Pereira BASTOS, Claudia Maria Antunes UCHÔA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Enteropatógenos Ambientais, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense. Rua Prof. Ernani Pires de Melo, 101, Sala 212C, São Domingos, Niterói, RJ, Brasil. Tels: (21) 2629-2426, 7838-4801. E-mail: claudiauchoa@vm.uff.br

Recebido: 24.05.2013 - Aceito para publicação: 20.08.2013

RESUMO

Foram analisadas por técnicas parasitológicas de sedimentação e de flutuação 100 amostras de alfaces crespas de duas feiras livres, da Zona Norte do Rio de Janeiro (RJ), sendo 50 de cultivo tradicional e 50 de cultivo hidropônico. Doze amostras (12 %) apresentaram positividade para formas evolutivas de helmintos ou protozoários de importância médico-veterinária, como cisto de amebídeo, oocisto de coccídeo e ovos de helmintos da superfamília Ancylostomatoidea e a frequência de positividade foi similar nas amostras de cultivos tradicional e hidropônico. Detectou-se contaminação por organismos em vida livre, sem associação com as formas evolutivas de parasitas, em 85 % das amostras. A presença de contaminantes na maioria das amostras, com detecção de formas evolutivas de parasitas intestinais de seres humanos ou de outros animais, indica que estas hortaliças podem representar uma potencial fonte de contaminação para o ser humano, e serem inadequadas para o consumo sem a devida higienização.

Palavras-chave. alface, contaminação de alimentos, helmintos, protozoários.

ABSTRACT

One hundred samples of lettuce were collected from two free markets in the North Zone of Rio de Janeiro, Brazil, being 50 samples of traditional cultivation and 50 of hydroponic one. These samples were analyzed by means of parasitological sedimentation and flotation techniques. Twelve (12 %) samples were positive for evolutionary forms of helminths or protozoa of medical and veterinary importance, as cyst of amoebids, oocyst of coccidian and eggs of helminths of Ancylostomatoidea superfamily, and similar frequency of positive samples was found among the lettuce samples of traditional and hydroponic cultivations. Contamination with free living organisms was detected, but without association with the evolving forms of parasites in 85 % of samples. The presence of contaminants in the majority of samples, with detection of evolutive forms of human or other animals intestinal parasites, indicate that these vegetables may represent a potential source of contamination for humans, and they are unsuitable for consumption before being properly disinfected.

Keywords. lettuce, food contamination, helminthes, protozoa.

INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa*) é uma das hortaliças mais comercializadas no Brasil, devido ao costume do consumo de saladas, que são importantes fontes de fibras alimentares, de baixo teor calórico, na dieta dos indivíduos¹. Além disso, a alface fornece sais minerais, cálcio e vitaminas, especialmente a vitamina A². Por ser esta hortaliça muito consumida, é comercializada em diversos tipos de estabelecimentos, como supermercados, feiras livres e sacolões, sendo as variedades lisa e crespa as mais encontradas no país³.

A forma tradicional de cultivo é a empregada pela maioria dos pequenos produtores, pois apresenta manejo relativamente simples e baixo custo de produção⁴. Por sua vez, o cultivo hidropônico protege a hortaliça de fatores adversos oriundos do meio ambiente, como chuvas, geadas e ventos fortes, favorecendo uma maior produtividade⁵.

As hortaliças em geral, devido a sua forma de cultivo, armazenamento, comercialização e transporte, podem representar importantes veículos de transmissão de enteropatógenos para hospedeiros susceptíveis^{6,7}. Dentre estes, os enteroparasitos são de elevada prevalência nos países em desenvolvimento, estando associados à baixa qualidade higiênico-sanitária e grupos sociais desfavorecidos⁸. A forma de transmissão mais comum destas parasitoses ocorre por via oral, por meio da ingestão de água e/ou alimentos contaminados por formas evolutivas infectantes de parasitos, representadas por cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos^{9,10}, bem como, mais raramente, larvas de nematóides¹¹.

Em diversas regiões do mundo, é comum adubar hortas e plantações, com fezes humanas e/ou utilizar água potencialmente contaminada na irrigação¹². No Brasil, a contaminação de alimentos, sobretudo de hortaliças, dá-se principalmente pelo uso de dejetos de animais domésticos e de água infectada por material fecal de origem humana ou de outros animais utilizada na irrigação, sendo considerada uma das principais fontes de transmissão de enteroparasitoses^{13,14}.

A contaminação da alface por enteroparasitos pode estar relacionada a diversos fatores, como o solo e a água de irrigação, contaminados por fezes, entulhos e esgotos¹⁵, a adubação de hortas e locais de produção com fezes de animais¹⁶, o armazenamento impróprio e recipientes contaminados¹⁶, as práticas de lavagem em

tanques de água parada¹⁷ ou a falta de higiene pessoal por manipuladores de alimentos^{18,19}.

No Brasil e no mundo relata-se a importância da alface como veículo de transmissão de formas infectantes de parasitos^{20,21}. Vários estudos vêm demonstrando variação na frequência de contaminação parasitária em amostras de alface crespa²²⁻²⁵, devido a diferentes localidades de coleta, técnicas utilizadas no diagnóstico, tipos de hortaliças estudadas e formas de cultivo^{10,19,22}.

Considerando a interferência de vários fatores na contaminação da alface, o objetivo deste estudo foi identificar a contaminação parasitária em alfaces da variedade crespa, de cultivos tradicional e hidropônico, comercializadas em duas feiras livres da Zona Norte do município do Rio de Janeiro (RJ).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 100 amostras de alface crespa (*Lactuca sativa* var. *crispa*), sendo 50 de cultivo tradicional e 50 de cultivo hidropônico, no período de abril a novembro de 2012. As amostras foram coletadas em duas feiras livres da zona norte do município do Rio de Janeiro (RJ), por conveniência dos autores, estando uma localizada no Méier e outra na Tijuca. As coletas foram realizadas uma vez por semana durante oito semanas, totalizando 25 unidades de cada feira por tipo de cultivo, sendo analisadas, em seis semanas, oito unidades amostrais por localidade e, nas duas semanas restantes, dois pés de alface por feira. Cada unidade amostral foi constituída por um pé ou touceira.

O Méier é um dos mais tradicionais e importantes bairros cariocas. É habitado, em sua maioria, por famílias de classe média e é o décimo sétimo bairro carioca com maior Índice de Desenvolvimento Humano (0,931), sendo um dos mais valorizados da Zona Norte²⁶. A Tijuca é vista como um dos bairros mais tradicionais e de urbanização mais antiga do Rio e é considerado um bairro de classe média à classe média alta²⁷.

Em ambas as feiras os comerciantes informaram que as hortaliças eram originárias da Região de Teresópolis (RJ). Foram escolhidas, aleatoriamente, quatro barracas de hortaliças em cada feira – duas de cada lado da rua – sendo que todas deveriam comercializar alfaces dos dois tipos de cultivo. Foram obtidas duas unidades de alface por vendedor, uma de cada forma de cultivo, independente de seu tamanho ou peso, sendo

aconditionadas, individualmente, em sacos plásticos primo-utilizados.

As amostras foram processadas no mesmo dia no Laboratório de Enteropatógenos Ambientais, da Disciplina de Parasitologia, do Instituto Biomédico, da Universidade Federal Fluminense (UFF). Seguiu-se o protocolo proposto por Mesquita et al²⁸, com algumas modificações. Cada alface foi desfolhada em vasilhame plástico retangular, previamente higienizado, sendo removida a raiz, quando presente. As folhas foram lavadas manualmente e individualmente, com 500 mL de solução a 1 % de Tween 80 (Vetec[®]), no sentido extremidade da folha-caule. Após a lavagem, todas as folhas foram descartadas e o líquido resultante filtrado em gaze sobre um tamis, apoiado em dois cálices de vidro com fundo cônico, de volume 350 mL, e deixado para sedimentar por 21 horas.

O sobrenadante dos cálices foi descartado e os sedimentos homogeneizados e transferidos para um tubo de centrífuga de fundo cônico, com volume de 15 mL. O material foi aliquoteado para processamento pelas técnicas de Ritchie modificada por Young et al²⁹, segundo o protocolo de Cerqueira³⁰, e de Sheather modificada por Huber et al³¹.

Para mensuração de formas evolutivas de parasitos, utilizou-se microscópio óptico monocular Olympus[®] CH30, com ocular micrométrica Olympus[®] SWH, sendo os dados dispostos na forma de média \pm desvio-padrão (Microsoft Office[®]).

Os resultados sobre a ocorrência de contaminação parasitária nos diferentes tipos de alface foram analisados pelo teste χ^2 (qui-quadrado), utilizando o software IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, New York, USA). Análises que apresentassem um intervalo de confiança superior a 95 % ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

RESULTADOS

Considerando as 100 amostras de alface cresa estudadas, 12 % apresentaram positividade para formas evolutivas de parasitos de seres humanos e/ou de outros animais. Oito destas foram coletadas no Méier e quatro na Tijuca. Das quatro amostras da Tijuca, duas foram de cultivo tradicional e duas de cultivo hidropônico. Já das amostras coletadas no Méier, quatro foram de cultivo tradicional e quatro de cultivo hidropônico. Três amostras foram negativas pelas duas técnicas

parasitológicas, sendo uma de cultivo tradicional (Méier) e duas de cultivo hidropônico (Tijuca). Das 100 amostras, 85 % apresentaram positividade apenas para contaminantes ambientais, como formas evolutivas de nematóides em vida livre e de artrópodes (Tabela 1). Não se obteve diferença significativa entre o tipo de cultivo, considerando a presença de contaminantes independente de serem em vida livre ou de origem parasitária ($p=0,344$).

Tabela 1. Frequência de contaminação parasitária em amostras de alface cresa, de cultivos tradicional e hidropônico, oriundas de feiras livres de dois bairros da cidade do Rio de Janeiro (RJ)

Tipo de Alface	Bairro	Positivo (%)		Negativo (%)	Total* (%)
		C (%)**	C + FP (%)***		
Tradicional	Méier	20	4	1	25
	Tijuca	21	4	1	25
Hidropônica	Méier	23	2	0	25
	Tijuca	21	2	2	25
Total (%)		85 (85 %)	12 (12 %)	3 (3 %)	100 (100 %)

C: contaminantes (formas evolutivas de helmintos em vida livre e de artrópodes)

FP: formas evolutivas de parasitos (helmintos da superfamília Ancylostomatoidea, oocisto de coccídio não esporulado e cisto de amebídeo)

p-valor do teste qui-quadrado (p1 – contaminantes totais incluindo C e C+FP, p2 – apenas C e p3 – apenas C+FP)

* $p1=0,344$

** $p2=0,345$

*** $p3=0,268$

As formas evolutivas parasitárias com morfologia similar a de parasitos de seres humanos e/ou de outros animais encontradas foram: oocisto não esporulado de coccídio em duas (4 %) amostras de cultivo hidropônico (Tijuca), cisto de amebídeo com menos de quatro núcleos em uma (2 %) amostra de cultivo tradicional (Méier) e ovos de nematóides da superfamília Ancylostomatoidea em três (6 %) amostras de cultivo tradicional e três (6 %) de cultivo hidropônico. Nas seis amostras positivas para nematóides da superfamília Ancylostomatoidea, foram evidenciados nove ovos, os quais apresentaram tamanho médio de $56,7 \pm 11,7 \mu\text{m} \times 34,5 \pm 4,8 \mu\text{m}$.

Dentre os contaminantes, observou-se maior frequência de formas evolutivas de artrópodes, seguida por larvas de nematóides em vida livre. Não se observou diferença significativa entre as frequências obtidas nas amostras de cultivos tradicional e hidropônico (Tabela 2).

Tabela 2. Número absoluto e frequência de formas evolutivas recuperadas de helmintos, artrópodes e protozoários, em 50 amostras de alface cresa de cultivo hidropônico e 50 amostras de alface cresa de cultivo tradicional, de duas feiras livres dos bairros Méier e Tijuca, do município do Rio de Janeiro (RJ), no período de abril a novembro de 2012

Formas evolutivas	Alface	Alface
	Tradicional (n=50)	Hidropônica (n=50)
Ovos de nematóides em vida livre	10 (20 %)	07 (14 %)
Larvas de nematóides em vida livre	37 (74 %)	39 (78 %)
Adultos de nematóides em vida livre	14 (28 %)	15 (30 %)
Artrópodes	44 (88 %)	46 (92 %)
Oocisto de coccídeo não esporulado	00 (0 %)	02 (4 %)
Cisto de amebídeo	01 (2 %)	00 (0 %)
Ovos de nematóides da superfamília Ancylostomatoidea	03 (6 %)	03 (6 %)

DISCUSSÃO

Neste estudo, obteve-se baixa positividade parasitária (12 %) e pequena diversidade de formas evolutivas de espécies de parasitos de seres humanos e/ou de outros animais, tanto nas amostras hidropônicas como nas de cultivo tradicional. Estes resultados diferem dos obtidos por Guimarães et al²² e por Falavigna et al³², que obtiveram cinco grupos de parasitos e frequência de contaminação de até 23,3 % e 15 grupos de parasitos e frequência de 70 %, respectivamente. Norberg et al³³ e Neres et al¹⁰ também detectaram maior diversidade parasitária e frequência superior à do presente estudo. Por outro lado, os resultados obtidos aproximam-se dos de Mesquita et al²⁸, que evidenciaram dois grupos de parasitos e frequência de contaminação parasitária em 6,6 % das amostras de hortaliças estudadas.

Guimarães et al²² sugerem que a variação no tipo ou na frequência de parasitos intestinais em hortaliças, quando se comparam diversos estudos, é explicada, em parte, pela localidade do estudo, pelos tipos de hortaliças utilizados e até pela metodologia empregada no exame parasitológico. Montanher et al³⁴ associaram a positividade em alfaces à utilização de água de irrigação contaminada. No caso da alface cresa, a estrutura compacta, com múltiplas folhas e configuração ondulada, favorece maior fixação de estruturas parasitárias, conferindo resistência aos processos de higienização^{32,33}. Por outro lado, Melo et al⁹ atribuem

estas diferenças de contaminação ao clima. O índice de contaminação das hortaliças, segundo Cantos et al¹⁹, pode ser influenciado por seu acondicionamento e transporte, geralmente em veículos abertos, tornando-as susceptíveis à contaminação fecal pela ação do vento, por exemplo.

Os resultados obtidos demonstram elevada contaminação por organismos em vida livre nas amostras analisadas. Noventa e sete amostras apresentaram formas evolutivas de nematóides em vida livre ou de artrópodes, sendo que em doze destas observou-se associação de formas evolutivas de parasitos aos contaminantes. Entretanto, sabe-se que tais agentes biológicos apresentam baixo risco de infecção para o hospedeiro humano. Esta contaminação nas amostras dos dois bairros pode refletir, para as amostras de cultivo tradicional, estreito contato com o solo, o que favorece a veiculação de formas evolutivas de helmintos que naturalmente vivem neste ambiente²⁴. Nas amostras de cultivo hidropônico, Neres et al¹⁴ atribuem a presença de contaminantes a uma forma inadequada de cultivo ou à condição higiênica insatisfatória da água utilizada na irrigação, principalmente na forma de solução nutritiva. No presente estudo, por não ser exatamente conhecido o local de produção, não foi possível determinar com certeza a fonte de contaminação das alfaces hidropônicas.

O encontro de elevada frequência de organismos em vida livre concorda com os resultados obtidos por Guimarães et al²², que estudaram 120 amostras de alfaces no município de Lavras (MG), e com os de Santana et al¹, que analisaram 180 amostras de alfaces, de cultivos hidropônico, tradicional e orgânico, no município de Salvador (BA). Ambos os estudos obtiveram presença de contaminantes em todas as amostras. A frequência de contaminação obtida também foi superior à de Ferro et al²⁵, que evidenciaram organismos em vida livre em 71 % de 100 amostras de alfaces no município de Tangará da Serra (MT). Por outro lado, esta foi inferior à obtida por Mesquita et al²⁸, em 128 hortaliças (96,1 %), comercializadas em Niterói (RJ) e no Rio de Janeiro (RJ). A detecção destes contaminantes demonstram a sensibilidade das técnicas utilizadas para o encontro de formas evolutivas de helmintos, protozoários e artrópodes, como sugerido por Mesquita et al²⁸. A presença desse tipo de contaminação indica qualidade higiênica insatisfatória das alfaces comercializadas nas feiras livres.

Considerando o tipo de cultivo, as alfaces hidropônicas apresentaram frequência de contaminação similar, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as amostras estudadas, tanto por

parasitos de importância médico-veterinária como por organismos em vida livre, quando comparadas com as de cultivo tradicional. Este resultado discorda dos obtidos por Neres et al¹⁴, que evidenciaram alfaces hidropônicas com maior frequência de contaminação, associada pelos autores à contaminação da água utilizada na produção, e de Santana et al¹, que encontraram alfaces hidropônicas com menor frequência de contaminação, quando comparadas com alfaces de cultivos tradicional e orgânico, associando o resultado encontrado ao ambiente sanitário onde são cultivadas.

O cultivo hidropônico, pela própria forma de manejo, apresenta menor possibilidade de contaminações ambiental e humana, quando confrontado com o cultivo tradicional. Santana et al¹ afirmam que a presença de contaminantes em amostras de cultivo hidropônico é injustificável, estando a positividade associada à condição higiênico-sanitária inadequada da água de irrigação, que se mistura aos nutrientes utilizados no cultivo das hortaliças.

A observação de frequência similar de contaminação entre as alfaces hidropônicas e de cultivo tradicional, sem diferença significativa ($p=0,344$), pode ter sido devido a práticas inadequadas realizadas pelos comerciantes no processo de exposição nas duas feiras estudadas. Estas ações podem propiciar o contato direto entre os diversos produtos comercializados na mesma barraca ou submetê-los a condições similares de contaminação por meio da água utilizada pelo feirante. Outro fator que pode ter interferido na similaridade de contaminação é a origem comum das hortaliças, pois segundo informações dos feirantes das duas feiras, todas eram oriundas de Teresópolis (RJ). Falavigna et al³² sugerem que o hábito dos feirantes de imergir as hortaliças em água antes de sua exposição, para melhorar sua aparência, pode favorecer sua contaminação. Já Norberg et al³³ relataram para a possibilidade de contaminação devido à prática de irrigação, pelo método de aspersão, realizada durante a exposição das hortaliças nas feiras livres, já que nesses locais o recipiente em que se armazena a água, muitas vezes não tem higiene adequada e a água pode ser reutilizada. Tais ações possibilitariam a dispersão de formas evolutivas de agentes biológicos entre estes vegetais, independente do tipo de cultivo.

Nas amostras deste estudo, dentre os organismos em vida livre, detectou-se maior frequência de formas evolutivas de artrópodes, seguido de larvas de nematóides. Montanher et al³⁴

e Quadros et al³⁵ também detectaram a presença de artrópodes em alfaces cresas. A contaminação por artrópodes foi mais frequente nas amostras hidropônicas. Este resultado discorda dos de Santana et al¹, que não evidenciaram artrópodes nas amostras deste tipo de cultivo. Por sua vez, larvas de nematóides também foram detectadas nas amostras estudadas por Mesquita et al²⁸, estando tais estruturas ausentes nas alfaces analisadas por Santana et al¹.

Não foi possível identificar as espécies das formas evolutivas de parasitos detectados no estudo. No caso dos coccídios, eles encontravam-se não esporulados e em pequena quantidade, bem como em relação ao cisto de amebídeo. Os ovos encontrados apresentaram tamanho médio de $56,7 \pm 11,7 \mu\text{m} \times 34,5 \pm 4,8 \mu\text{m}$. Essas medidas foram menores do que as relacionadas aos ovos de ancilostomídeos que parasitam seres humanos, como *Ancylostoma duodenale* ($60 \times 56 \mu\text{m}$), *Necator americanus* ($76 \times 64 \mu\text{m}$) ou *Ancylostoma ceylanicum* ($60 \times 55 \mu\text{m}$)³⁶, e apresentaram tamanho maior do que os ovos de nematóides em vida livre encontrados nas amostras, em associação a fêmeas com ovos em seu interior. Deve-se ressaltar que a morfologia e o tamanho entre as diversas espécies da superfamília Ancylostomatoidea, que infectam animais, dentre eles os seres humanos, são bastante similares, o que impede a identificação correta do nematóide³², a qual na maioria das vezes só é possível pelo encontro de adultos. Outro elemento importante a ser considerado é que existe uma variação de tamanho entre os ovos eliminados pelas fêmeas de parasitos, o que pode determinar sobreposição das medidas morfométricas de ovos de espécies distintas.

A recuperação de formas evolutivas de parasitos e de organismos em vida livre foi realizada por meio da lavagem sistematizada das folhas, o que permite sugerir que a correta higienização destas poderia minimizar ou mesmo eliminar o risco de infecção parasitária, associada à ingestão de hortaliças *in natura*. Esta prática é preconizada por Avcioglu et al³⁷, que verificaram que a lavagem de vegetais consumidos crus não só previne a infecção por helmintos, como reduz o risco de aquisição de bactérias patogênicas, que representam um problema crescente nas nações desenvolvidas. Entretanto, falhas na higienização podem resultar em consumo de alimentos contaminados, como foi evidenciado por Paula et al³⁸, que detectaram positividade em 6,6 % das amostras de alfaces processadas, disponibilizadas em restaurantes *self-service*, do município de Niterói (RJ).

CONCLUSÃO

O tipo de cultivo das hortaliças não interferiu na frequência de formas evolutivas de parasitos ou de contaminantes biológicos em vida livre. As amostras apresentaram baixa frequência de formas evolutivas de parasitos, representando pequeno risco epidemiológico na transmissão de enteroparasitoses. Sob a análise microscópica, a qualidade das alfaces foi considerada insatisfatória, o que evidencia a importância da utilização de práticas de higienização adequadas antes do consumo.

AGRADECIMENTOS

A Gabriel Martins (UFF), pelo o auxílio na análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. Santana LRR, Carvalho RDS, Leite CC, Alcântara LM, Oliveira TWS, Rodrigues BM. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes formas de cultivo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(2):264-9.
2. Moraes FA, Cota AM, Campos FM, Pinheiro-Sant'ana HM. Perdas de vitamina C em hortaliças durante o armazenamento, preparo e distribuição em restaurantes. *Ciênc Saúde Colet*. 2010;15(1):51-62.
3. Mogharbel ADI, Masson ML. Perigos associados ao consumo da alface (*Lactuca sativa*), *in natura*. *Alim Nutr Araraquara*. 2005;16(1):83-8.
4. Biscaro GA, Guimarães-Tomazela AB, Cruz RL, Lopes MDC. Aspectos sanitários do cultivo da alface americana, irrigada com águas receptoras de efluentes urbanos. *Ciênc Agrotec*. 2008; 32(1):295-301.
5. Silva DF, Michelon N, Orsini F, Tromboni F, Gianquinto GP. Manual prático de horticultura hidropônica para cultivas hortaliças em área urbana e periurbana. Piauí: Codecrop; 2007.
6. Oliveira CAF, Germano, PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo – SP, Brasil. I – Pesquisa de helmintos. *Rev Saúde Pública*. 1992;26(4):283-9.
7. Oliveira CAF, Germano PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo – SP, Brasil. II – Pesquisa de protozoários intestinais. *Rev Saúde Pública*. 1992;26(5):332-5.
8. Frei F, Juncansen C, Ribeiro-Paes JT. Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: viés analítico decorrente do tratamento profilático. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24(12):2919-25.
9. Melo ACFL, Furtado LFV, Ferro TC, Bezerra KC, Costa DCA, Costa LA, et al. Contaminação parasitária de alfaces e sua relação com enteroparasitoses em manipuladores de alimentos. *Rev Tropic Ciênc Agr Biol*. 2011;5(3):47-52.
10. Silva JC, Furtado LFV, Ferro TC, Bezerra KC, Borges EP, Melo ACFL et al. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do Estado do Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):100-2.
11. Pedroso RS, Siqueira RV. Pesquisa de cistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos em chupetas. *J Pediatr*. 1997; 73(1):21-5.
12. Shahnazi M, Jafari-Sabet M. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in villages of Qazvin Province, Iran. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(9):1025-30.
13. Prado SPT, Ribeiro EGA, Capuano DM, Aquino AL, Rocha GM, Bergamini AMM. Avaliação microbiológica, parasitológica e da rotulagem de hortaliças minimamente processadas comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):221-7.
14. Neres AC, Nascimento AH, Lemos KRM, Ribeiro EL, Leitão VO, Pacheco JBP, et al. Enteroparasitos em amostras de alface (*Lactuca sativa* var. *crispa*), no município de Anápolis, Goiás, Brasil. *Biosci J*. 2011; 27(2): 336-41.
15. Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Stott R. Redução dos riscos para a saúde com a utilização agrícola de águas residuais: mudanças recomendadas nas pautas da Organização Mundial da Saúde – OMS. [acesso 2012 Nov 05]. Disponível em: [http://www.ruaf.org/sites/default/files/AU3oms.pdf].
16. Chitarra MIF. Processamento mínimo de frutos e hortaliças. Lavras: UFLA; 2000.
17. Evangelista J. Contaminações de alimentos. *In: Evangelista J. Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 1992. p.153-85.
18. Silva-Junior EA. Fundamentos em microbiologia importantes. *In: Silva-Junior EA. Manual de Controle Higiênico-Sanitário de Ambientes*. São Paulo: Varela; 1995. p.38.
19. Cantos GA, Soares B, Maliska C, Gick D. Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis, Santa Catarina. *NewsLab*. 2004; 66:154-63.
20. Kozan E, Gonenc B, Sarimehmetoglu O, Aycicek H. Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control*. 2005; 16:239-42.
21. Daryani A, Eftehad GH, Sharif M, Ghorbani L, Ziaei H. Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Control*. 2008;19:790-4.
22. Guimarães AM, Alves EGL, Figueiredo HCP, Costa GM, Rodrigues LS. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):621-3.
23. Freitas AA, Kwiatkowski A, Nunes SC, Simonelli SM, Sangioni LA. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do município de Campo Mourão, Estado do Paraná. *Rev Ciênc Saúde*. 2004; 26(4):381-4.
24. Rocha A, Mendes RA, Barbosa CS. *Strongyloides* spp. e outros parasitos encontrados em alfaces (*Lactuca sativa*), comercializados na cidade do Recife, PE. *Rev Patol Trop*. 2008; 37(2):151-60.
25. Ferro JJB, Costa-Cruz JM, Barcelos ICS. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em Tangará da Serra, Mato Grosso, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2012;41(1):47-54.
26. Rio de Janeiro. Meier. Disponível em <http://www.oriodejaneiro.net/meier.htm>. capturado em 25 de julho de 2013.
27. Rio de Janeiro. Tijuca. Disponível em <http://www.oriodejaneiro.net/meier.htm>. capturado em 25 de julho de 2013.
28. Mesquita VCL, Serra CMB, Bastos OMP, Uchôa CMA. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(4):363-6.

29. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl Acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol*. 1979;10(6):852-3.
30. Cerqueira FL. Coprotest: metodologia confiável para exame parasitológico de fezes. *LAES/HAES*. 1988;5(51):5-12.
31. Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparação da eficiência da Técnica de Sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2003;12(2):135-7.
32. Falavigna LM, Freitas CBR, Melo GC, Nishi L, Araújo SM, Falavigna-Guilherme AL. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitol Latinoam*. 2005;60:144-9.
33. Norberg AN, Ribeiro PC, Gonçalves JS, Sanches FG, Silveira VFC, Oliveira MF, et al. Prevalência de ovos, larvas, cistos e oocistos de elementos parasitários em hortaliças comercializadas no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Ciênc Tecnol*. 2008;8(1):12-21.
34. Montanher CC, Coradin DC, Fontoura-da-Silva SE. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes *self-service* por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. *Est Biol*. 2007;29(66):63-71.
35. Quadros RM, Marques SMT, Favaro DA, Pessoa VB, Arruda AAR, Santini J. Parasitos em alfaces (*Lactuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages - Santa Catarina. *Rev Ciênc Saúde*. 2008; 1(2):78-84.
36. Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
37. Avcioglu H, Soykan E, Tarakci U. Control of helminth contamination of raw vegetables by washing. *Vector-Borne Zoon Dis*. 2011;11(2):189-91.
38. Paula P, Rodrigues PSS, Tórtora JCO, Uchôa CMA, Farage S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes *self-service* de Niterói (RJ). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(4):535-7.

Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos por meio de técnica *time kill*

Analysis of *in vitro* antimicrobial activity of antiseptics products by means of time kill assay

RIALA6/1568

Hilda do Nascimento NÓBREGA*, Joana Angélica Barbosa FERREIRA, Célia Maria Carvalho Pereira Araújo ROMÃO, Ivano Raffaele Victorio de Filippis CAPASSO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Produtos Não Estéreis, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. CEP 21040-900.

E-mail: hilda.nobrega@incqs.fiocruz.br, hildanobrega@gmail.com

Recebido: 23.05.2013 - Aceito para publicação: 13.08.2013

RESUMO

Inúmeros agentes químicos (álcoois, iodóforos, clorexidina, etc.) são utilizados em laboratórios e indústrias. Ao contrário dos desinfetantes, não há padrões e critérios específicos para avaliar a atividade de antissépticos. Neste trabalho foi estudada a atividade antimicrobiana de antissépticos, utilizando-se o ensaio *Time Kill* (Hobson & Bolsen), que avalia a população de micro-organismos aeróbios em período de tempo específico, diante de agentes antimicrobianos. Foram avaliadas duas metodologias de recuperação dos micro-organismos: filtração por membrana e semeadura em profundidade. A filtração por membrana foi menos sensível. A semeadura em profundidade demonstrou maior sensibilidade com maior contagem de colônias. De 25 amostras de produtos, os antissépticos à base de digluconato de clorexidina foram insatisfatórios e ineficazes para todas as cepas de micro-organismos de referência, correspondendo a 20 % das amostras analisadas. Estes produtos apresentaram-se satisfatórios frente às cepas de origem clínica. Portanto, estes produtos devem ser utilizados com cautela e estudos adicionais são necessários, pois são escassas as informações sobre sua eficácia. Os dados deste estudo poderão auxiliar as ações de vigilância sanitária e de saúde pública na elaboração de futuras legislações, pois estes produtos são encontrados no comércio, mas sem seguir nenhuma legislação específica.

Palavras-chave. atividade antimicrobiana, antisséptico, tempo de morte, neutralização.

ABSTRACT

Many chemicals (alcohol, iodophor, chlorhexidine, etc) are used in laboratories and industries. Unlike disinfectants, no specific norms and criteria have been standardized for evaluating the antiseptics activity. This study analyzed the antimicrobial activity of antiseptics using Time Kill Test (Hobson & Bolsen). This assay assessed the evolution of a population of aerobic microorganisms in a specific period of time when tested against antimicrobial agents. Two different recovery methodologies were evaluated: membrane filtration and pour plate technique. The membrane filtration assay was less sensitive. Pour plate technique showed high sensitivity with high colonies counts. Of 25 samples of products analyzed, only the chlorhexidine digluconate-based antiseptics were unsatisfactory, showing no efficacy on all reference micro-organisms strains, and corresponded to 20 % of analyzed samples. However, they were efficacious against clinical strains. Therefore, these products should be used with caution and further studies are needed, as data on its efficacy have still been scarce. These findings might give support to the health surveillance and public health in establishing the future legislation, as these products have been available on the market, but without following any specific legislation.

Keywords. antimicrobial activities, antiseptic, time kill, neutralization.

INTRODUÇÃO

Assepsia é o conjunto de medidas adotadas para impedir a introdução de agentes patogênicos no organismo e no ambiente e inclui procedimentos de antisepsia, desinfecção e esterilização¹. A antisepsia consiste na utilização de produtos (microbiocidas ou microbostáticos) sobre a pele ou mucosa com o objetivo de reduzir os micro-organismos existentes, e tais produtos são classificados como antissépticos. Na assistência à saúde, sua principal função é o preparo da pele, como higienização das mãos e antes de alguns procedimentos².

Estudos realizados na Europa em pacientes de UTIs demonstraram que os micro-organismos mais encontrados foram as enterobactérias, seguidas pela *P. aeruginosa*. No Brasil, também é possível observar a ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em diferentes hospitais do Rio de Janeiro³⁻⁵.

O Ministério de Saúde define infecção hospitalar como aquela adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorre durante a internação e em decorrência de procedimentos hospitalares². Também a Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990⁶, estabelece como objetivo e atribuição do Sistema Único de Saúde (SUS), “onde estão incluídas também ações de prevenção de infecções”⁷.

Muitos antissépticos se mostram mais eficazes em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas, embora esta diferença não seja tão clara como na atividade dos antibióticos, de um modo geral, antissépticos e desinfetantes devem ser usados quando há estudos científicos que demonstrem benefício ou quando existe uma forte justificativa teórica para a utilização de germicidas^{8,9}.

Um número considerável de agentes químicos é utilizado tanto em laboratórios quanto nos estabelecimentos de saúde e nas indústrias, incluindo álcoois, iodóforos, fenóis sintéticos e compostos quaternários de amônio, clorexidina entre outros. Entretanto, não existe um antisséptico que atenda a todas as situações e necessidades encontradas, sendo preciso conhecer as características de cada um para que se tenham subsídios suficientes que permitam a escolha correta do produto, evitando custos excessivos e uso inadequado¹⁰.

Um antisséptico ideal deve ser capaz de destruir a forma vegetativa de todos os micro-organismos patogênicos, requerer tempo limitado de exposição

e ser eficaz em temperatura ambiente, além de não ser corrosivo, apresentar baixa toxicidade para seres humanos e ser de baixo custo. O grau de seletividade para os agentes antissépticos pode variar, dependendo dos tecidos com os quais entram em contato¹¹.

Os vários antissépticos e desinfetantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação: agentes que desnaturam as proteínas; agentes que causam lise osmótica da célula; e agentes que interferem em processos metabólicos específicos levando à morte do micro-organismo¹⁰.

A clorexidina possui ampla atividade antimicrobiana, porém inativa os micro-organismos numa taxa muito mais lenta do que a do álcool etílico. Sua atividade persiste, embora sua eficácia seja reduzida por materiais orgânicos e altos valores de pH¹².

Os álcoois (etílico, etanol, isopropanol) possuem excelente atividade contra todos os grupos de micro-organismos, exceto os esporos, e possuem baixa toxicidade, embora tenham tendência a ressecar a superfície da pele, devido à remoção dos lipídios. Além disso, não possuem atividade residual e são ativados por matéria orgânica. Por conseguinte, é necessário limpar a superfície da pele antes da aplicação do álcool¹³.

O iodo penetra rapidamente através da parede celular do micro-organismo. Seu efeito letal é atribuído à inativação de proteínas e ácidos nucleicos interferindo de modo letal nos processos de síntese de proteínas¹⁰.

Atualmente, a Resolução RDC nº 42 de 2010, torna pública a proposta de resolução “Diretrizes para Disponibilização de Preparação Alcoólica para Fricção Antisséptica das Mãos pelos Serviços de Saúde”. Essa portaria tem o objetivo de executar e promover a higienização das mãos nos serviços de saúde por meio de preparações alcoólicas, previstas na Aliança Mundial para a segurança do paciente, com o intuito de prevenir e controlar as infecções relacionadas à assistência à saúde, visando a segurança do paciente e dos profissionais de saúde¹⁴.

Soluções diluídas de iodo possuem atividade mais rápida do que a das concentradas. A razão para tal ainda não está totalmente esclarecida, mas foi sugerido que a diluição do PVP-I resulta no enfraquecimento da ligação do iodo com o polímero carreador, aumentando a concentração de iodo na solução. Assim, o iodóforo deve ser adequadamente diluído para alcançar a atividade antimicrobiana¹⁰.

Os compostos fenólicos exercem atividade antimicrobiana lesando as membranas plasmáticas,

inativando as enzimas e desnaturando as proteínas. Os compostos de amônio quaternário são fortemente bactericidas contra as bactérias Gram-positivas e um pouco menos ativos contra as bactérias Gram-negativas¹⁵.

O controle da qualidade dos desinfetantes e antissépticos envolve análises químicas, toxicológicas e microbiológicas do rótulo. A análise microbiológica tem como objetivo comprovar a eficácia do produto para a finalidade a que se destina. Para avaliar a eficácia de desinfetantes, metodologias específicas foram estabelecidas (exemplos: Association of Official Analytical Chemists - AOAC, European Standards - EN), em que é recomendado o uso de micro-organismos de referência. No caso dos antissépticos, apesar da inexistência de metodologia oficial para produtos pronto-uso, também são utilizadas cepas de referência nos ensaios¹⁶.

Existem vários métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos antissépticos, dentre eles o protocolo do FDA, que inclui ensaios frente a: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Na Europa, o Comitê Europeu de Normalização estabeleceu diversos métodos, sendo que a EN 1040¹⁷ é preliminar e as demais são específicas para lavagem higiênica e escovação cirúrgica das mãos, desde preliminares até práticos, aplicáveis em sua maioria a produtos para serem utilizados diluídos¹⁸.

A atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano perante um determinado micro-organismo pode ser medida quantitativamente por métodos de diluição em meio de cultura líquido ou sólido. O resultado final é influenciado de maneira significativa pela metodologia, que deve ser cuidadosamente controlada para se obterem resultados reprodutíveis (intra e interlaboratório). Assim sendo, como no Brasil são comercializados diferentes tipos de antissépticos, é importante avaliar a qualidade dos produtos por meio de testes laboratoriais.

Uma das técnicas disponíveis é conhecida como *Time Kill* (Tempo de Morte). Nesta, uma diluição do produto-teste é colocada em contato com uma população conhecida de micro-organismos por um tempo de exposição específico a uma determinada temperatura. A atividade do produto de ensaio é inibida em intervalos na amostragem especificada com uma técnica de neutralização (diluição, agentes químicos ou outras) adequada e os micro-organismos sobreviventes contados.

O Guia Standard de Avaliação da Atividade Antimicrobiana cita este ensaio. Trata-se do

Procedimento de Estudo Teste ASTM E2315 *Time Kill*, no qual é avaliada a evolução de uma população de micro-organismos aeróbios num período de tempo específico, quando testado frente a agentes antimicrobianos. Outros autores também descrevem técnicas semelhantes ao *Time Kill* como Hobson e Bolsen¹⁹ que se baseiam em recomendações do FDA. A principal finalidade desse teste é avaliar a redução da população microbiana de ensaio depois de ter sido exposto a produtos de teste¹⁹.

Além da caracterização da amplitude do espectro de micro-organismos contra os quais o antimicrobiano é eficaz, o teste do tempo de morte também deve ser um dos critérios utilizados para caracterizar os produtos. O produto antisséptico é testado sobre o tempo e o número de micro-organismos sobreviventes determinados pela contagem direta. A curva de morte gerada deve mostrar a redução microbiana no intervalo de tempo do uso previsto do produto antimicrobiano^{7,19}.

Outros métodos utilizados pela comunidade europeia são baseados na capacidade dos produtos para reduzir a população microbiana. Por esses protocolos, os produtos devem atender à eficácia padrão: redução de 99,999 % na contagem de organismos no tempo estipulado pela técnica ou no tempo de contato recomendado pelo fabricante²⁰.

O objetivo desse estudo é avaliar a atividade antimicrobiana, pelo estudo *in vitro* de produtos antissépticos à base de iodopolividona, digluconato de clorhexidrina, cloreto de benzalcônico, triclosano, determinando para uma dada concentração de cada material-teste o tempo de exposição necessário para eliminar completamente o crescimento dos organismos específicos incluídos no teste. O teste seguiu a norma ASTM E 2315 tempo de morte descrito por Hobson e Bolsen¹⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas vinte e cinco amostras comerciais das preparações à base de PVP-I sol. degermante (iodopolividona 1 %), digluconato de clorhexidrina 0,2 %, 1 % e 4 %, nordexidina 0,5 % e 1 %, cloreto de benzalcônico 1 %, triclosano 0,2 %, 0,5 % e 1 %. A solução de etanol a 70 % serviu como controle positivo e a solução de etanol a 35 % como controle negativo.

Foram utilizados os seguintes micro-organismos de referência cedidos pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do

INCQS/FIOCRUZ: *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538), *Escherichia coli* INCQS 00032 (ATCC 11229), *Candida albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231). Foram incluídas também cepas de origem clínica, cedidas pela CMRVS de *S. aureus* e de *P. aeruginosa* isoladas de portador são e material clínico incluindo processos infecciosos em membros inferiores, urina e hemocultura.

Os inóculos foram preparados a partir de culturas de 24 horas em caldo caseína soja. Foram preparadas suspensões em solução de cloreto de sódio a 0,85 % estéril, diluindo até se obter turbidez equivalente a 0,5-McFarland ou 10^8 UFC/mL. Preparação das soluções de ensaio: os produtos antissépticos foram diluídos a 1:10 e também foram testados sem diluição. Foi utilizada a técnica baseada na descrição de Hobson e Bolsen¹⁹.

A 99 mL da solução-teste 1:10 (1 mL da amostra + 9 mL do diluente) e também do produto sem diluição foi adicionado 1mL da suspensão-teste (micro-organismo a aproximadamente 10^8 UFC/mL). Imediatamente em cada tempo designado (0, 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 30 minutos), foram retirados 3 mL da mistura (solução teste do antisséptico + suspensão do micro-organismo) e inoculados na porção de 1 mL em tubos contendo caldo Mueller Hinton, em triplicata. Aliquotas de 1 mL foram retiradas dos tubos com caldo Mueller Hinton, sendo uma alíquota semeada em Agar Mueller Hinton fundido e conservado à temperatura de aproximadamente 50 °C, semeado em profundidade e as outras duas alíquotas foram submetidas à filtração por membrana em filtro de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm. A seguir, as membranas foram colocadas sobre a superfície de Agar Mueller Hinton em placa. Foi realizado o mesmo procedimento para todos tempos de contato. As placas e os tubos foram incubados à temperatura de 35 ± 2 °C por 24/48 horas. Após o período de incubação, foi verificado o crescimento microbiano.

Controles: Foi adicionado 1 mL dos micro-organismos teste da suspensão 0,5-McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL) diluído até 10^{-8} em cinco tubos contendo a solução teste e caldo Mueller Hinton modificado (com 1 mL de polisorbato 80 e 1 mL de lecitina de soja); imediatamente foi plaqueado metade do volume dos tubos no tempo zero (T_0) em duplicata e metade após 30 minutos (T_{30}) em duplicata. Em seguida foram incubados, e registrados o número de UFC/mL.

Critérios de aceitação: Os produtos foram considerados antissépticos satisfatórios quando não ocorreu crescimento microbiano nos tempos de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 30 minutos e os controles mostraram crescimento tanto na presença quanto na ausência da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 35 amostras à base de: álcool etílico 70 % (A70%1, A70%2, A70%3, A70%4, A70%5); álcool etílico 35 % (B35%1, B35%2, B35%3, B35%4, B35%5); PVP-I solução degermante 1 % (C1%1, C1%2, C1%3, C1%4, C1%5); digluconato de clorexidrina (D0,2%1, D0,2%2, D1%3, D1%4, D4%5); nordexidina (E0,5%1, E0,5%2, E1%3, E1%4, E1%5); cloreto de benzalcônico (F1%1, F1%2, F1%3, F1%4, F1%5) e triclosano (G0,2%1, G0,5%2, G1%3, G1%4, G1%5). A Tabela 1 apresenta os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos antissépticos estudados, para as cepas de referência e as cepas clínicas.

Observa-se que as amostras à base de etanol a 35 % e de digluconato de clorexidina foram insatisfatórias para todas as cepas de micro-organismos de referência, porém apresentaram-se satisfatórias diante das cepas de origem clínica. Assim, das 25 amostras de produtos comerciais estudadas, 20 % foram insatisfatórias (Tabela 1).

Os resultados obtidos mostraram que os produtos possuem atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados, com exceção das amostras à base de digluconato de clorexidina, que em todas as fases do teste apresentou crescimento microbiano, quando avaliadas em comparação às cepas de referência.

Os produtos à base de clorexidina e a solução de etanol a 35 %, como foram insatisfatórios, proporcionaram uma avaliação da técnica de recuperação dos micro-organismos sobreviventes por meio de semeadura em profundidade e por filtração em membrana. A Figura 1 mostra os resultados dos ensaios realizados com as cepas de *P. aeruginosa*. Podemos observar que o método de semeadura em profundidade permitiu a recuperação de um número maior de micro-organismos.

Devido à importância das IRAS e da necessidade de medidas preventivas eficazes, a Portaria 2616/1998²¹ estabelece as diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares, incluindo, em seu Anexo V, uma relação de princípios ativos não recomendados para a finalidade de antisepsia, mas

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de produtos antissépticos frente a cepas de referência e cepas clínicas por técnica de *Time Kill*

Amostras de antissépticos	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 INCQS00039	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 INCQS00025	<i>E. coli</i> ATCC 1122 INCQS900032	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 INCQS40006	Cepas Clínicas <i>S. aureus</i>	Cepas Clínicas <i>P. aeruginosa</i>	Controles
	Direto/ Diluído	Direto/ Diluído	Direto/ Diluído	Direto/ Diluído	Direto/ Diluído	Direto/ Diluído	Direto/ Diluído
A 70%1	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%2	-S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%3	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%4	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%5	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
B 35%1	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%2	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%3	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%4	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%5	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
C 1% 1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
C 1% 2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
C 1%3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
C 1% 4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
C 1%5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
D 0,2%1	I I	I I	I I	I I	S S	S S	++
D 0,2%2	I I	I I	I I	I I	S S	S S	++
D 1%3	I I	I I	I I	I I	S S	S S	++
D 1%4	I I	I I	I I	I I	S S	S S	++
D 4%5	I I	I I	I I	I I	S S	S S	++
E 0,5% 1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
E 0,5%2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
E 1%3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
E 1% 4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
E 1% 5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
F 1%1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
F 1%2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
F 1%3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
F 1%4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
F 1% 5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
G 0,2%1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
G 0,5% 2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
G 1% 3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
G 1%4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++
G 1%5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	++

S: Satisfatório; I: Insatisfatório; + Presença de crescimento; /: Não realizado; A: álcool etílico 70 %;

B: álcool etílico 35 %; C: PVP-I solução degermante; D: digluconato de clorhexidrina; E: nordexidina; F: cloreto de benzalcônico; G: triclosano 1 %

não há menção aos recomendados para uso em seres humanos. Em tal legislação também é possível constatar o fato da inexistência de uma regulamentação específica com uma metodologia para o controle da eficácia de antissépticos em geral.

A clorexidina foi aprovada para o uso em escovas cirúrgicas em meados dos anos 1970, e como colutório a 0,12 %, no final da década 1980. No entanto, hoje já se encontram produtos mais eficientes. Não há relatos da eficácia deste produto como solução tópica até o momento. Apesar da clorexidina possuir ampla atividade antimicrobiana, a inativação dos micro-organismos ocorre muito mais lentamente quando comparada com o álcool, não sendo considerada eficiente para inativar micro-organismos Gram-negativos, mas apresentando uma maior eficácia contra bactérias Gram-positivas¹³.

O álcool também está entre os antissépticos mais seguros, não só por possuir baixa toxicidade, mas também pelo seu efeito microbicida rápido e por ser de fácil aplicação. Desta forma, provê rápida antisepsia em procedimentos como punções venosas e é excepcional para higienização das mãos².

A contaminação de soluções antissépticas não está sendo, até o momento, associada à redução de susceptibilidade dos micro-organismos. Portanto, qualquer que seja a molécula utilizada, os valores de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) devem ser conhecidos para permitir que a dosagem correta seja inferida para as necessidades de seu uso, e para que seja diluída ou inativada adequadamente antes de seu descarte²².

Para que haja o emprego correto dos antissépticos, do ponto de vista de custo e qualidade, é necessário que os produtos adquiridos tenham registro na Anvisa, venham acompanhados de certificado de análise do fabricante e que, na utilização, o estabelecimento disponha de um responsável farmacêutico para sua avaliação, aquisição e manipulação².

Atualmente a literatura existente sobre agentes químicos antimicrobianos utilizados em antisepsia ainda se apresenta confusa e contraditória, principalmente pela falta de padronização dos métodos de ensaio e, conseqüentemente, pela diversidade de condições experimentais¹³.

Considerando a missão do INCQS, que é a de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao

controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária, é importante, como já ressaltado, o estabelecimento de métodos que possam avaliar a qualidade dos produtos de interesse para a saúde, incluindo os antissépticos.

Pelos resultados obtidos foi possível verificar que, das 25 amostras comerciais avaliadas, apenas aquelas à base de clorexidina apresentaram insatisfatoriedade para o teste, ou seja, não foram capazes de destruir os micro-organismos de referência em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos de contato determinados pelo procedimento.

Adicionalmente, foi avaliado o procedimento de recuperação dos micro-organismos sobreviventes, no caso das amostras insatisfatórias. Assim, foram utilizadas as técnicas de semeadura em profundidade e filtração por membrana. Com base nos dados obtidos, observamos que a técnica por filtração por membrana mostrou-se menos sensível, uma vez que o número de colônias foi menor do que o obtido pela semeadura em profundidade, esta bem mais sensível, possibilitando a detecção de um maior número de colônias.

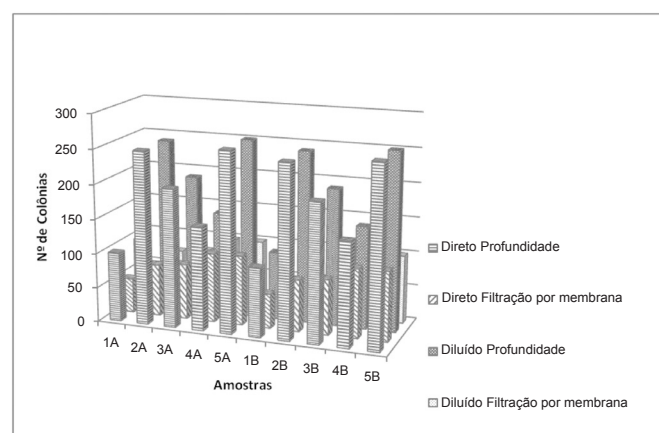


Figura 1. Comparação entre as amostras não diluídas e não diluídas de dicluconato de clorexidina e álcool etílico a 35 %, que apresentaram presença de *P. aeruginosa*, por semeadura em profundidade e filtração por membrana

Os antissépticos à base de digluconato de clorexidina não foram capazes de inibir o crescimento da *P. aeruginosa* ATCC 15442, INCQS 00025 e também dos outros micro-organismos (com exceção daqueles de origem clínica, que não apresentaram contagem). Esse dado é preocupante por se tratar de produto utilizado em ambiente hospitalar e pelo fato de *P. aeruginosa* ser um dos patógenos mais frequentes em

processos infecciosos de ambiente hospitalar^{5,22}. Os demais produtos antissépticos apresentaram atividade antimicrobiana nos tempos de contato empregados frente às cepas de referência e às cepas clínicas.

Alguns trabalhos descrevem a contaminação do digluconato de clorexidina, como fonte comprovada de surtos hospitalares. Ressalta-se a atividade dos produtos antissépticos, inclusive em sua menor concentração 0,1 %, como foi também observado por Reis et al²², que analisaram antissépticos à base de álcool etílico a 70 % e PVPI e obtiveram resultados semelhantes aos das amostras analisadas no presente estudo, utilizando as cepas de referência.

Estudando a atividade de antissépticos por um outro método *Time Kill*, testado apenas em relação à cepa de *Candida albicans*, Atayese et al²³ mostraram que tais produtos foram menos efetivos diante deste micro-organismo.

Entre todas as amostras de antissépticos testadas no presente estudo, apenas aquelas à base de clorexidina foram insatisfatórias quanto à inativação de micro-organismos considerados patológicos. Apesar de se tratar de um número baixo de amostras insatisfatórias, essa falha poderia ter graves consequências em um hospital, onde a assepsia é fator primordial para garantir a segurança de seus procedimentos de rotina. Entretanto, foi observado que as cepas clínicas mostraram-se susceptíveis aos produtos.

De um modo geral, um agente antimicrobiano deve apresentar as condições ideais para que tenha um amplo espectro de ação: ser estável em solução; ser compatível química e biologicamente com outros ingredientes da formulação; ser bem tolerado pelo tecido humano; não apresentar toxicidade em caso de um emprego prolongado. Na realidade, de acordo com Foster²⁴, nenhum dos antissépticos usuais reúne todas estas características, fato que deve ser cuidadosamente avaliado juntamente com as características antimicrobianas destes produtos²⁴.

Devido à sua alta resistência aos antimicrobianos, às bactérias do gênero *Pseudomonas*, que também são comuns no ambiente e muito resistentes a diversos produtos químicos, podendo até mesmo crescer em alguns antissépticos²⁵, ou não serem susceptíveis, como foi o caso do digluconato de clorexidina, o que foi comprovado neste trabalho.

Por se tratar de produtos que fazem parte de programas de controle e prevenção de infecções nos

estabelecimentos de saúde consideramos que o presente estudo é inédito, pois todas as publicações relacionadas discutem apenas a possível relação da contaminação com surtos em estabelecimentos de saúde; não há nesses estudos nenhuma informação sobre a atividade antisséptica medida por testes como o *Time Kill* descrito por Hobson e Bolsen¹⁹.

As análises realizadas nos permitem inferir que o teste *Time Kill* descrito por Hobson e Bolsen¹⁹ foi adequado para o estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos. Os resultados deste estudo trazem respostas para a prática do uso de antissépticos, que até o momento tem se mostrado apenas parcialmente eficaz do ponto de vista científico. Além disso, o presente trabalho aponta para a gravidade da inexistência de uma legislação específica. Podemos, portanto, afirmar que a utilização dos produtos estudados no processo de antisepsia é prática e segura, agregando facilidades e economia nas instituições de saúde.

CONCLUSÃO

Os produtos à base de álcool etílico, PVP-I solução degermante iodopolividona, nordexidina, cloreto de benzalcônio e triclosano, mostraram resultado satisfatório frente às cepas clínicas e de referência.

O digluconato de clorexidrina, apesar de ser menos tóxico, não mostrou atividade diante da *P. aeruginosa* e dos outros micro-organismos de referência. Concluímos, portanto, que esse produto deve ser utilizado com cautela e estudos adicionais são necessários, apesar de ter apresentado eficácia contra cepas clínicas.

A técnica de semeadura em profundidade mostrou-se mais sensível do que a de filtração em membrana para recuperação de micro-organismos sobreviventes após o contato com os antissépticos.

Nosso estudo poderá auxiliar as ações de vigilância sanitária e saúde pública na elaboração de futuras legislações, uma vez que esses produtos são encontrados no comércio, mas não estão submetidos a nenhuma legislação específica e não existem dados suficientes, até o momento, que atestem sua real eficácia.

REFERÊNCIAS

1. Moriya T, Módena JLP. Assepsia e antisepsia: técnicas de esterilização. *Medicina* (Ribeirão Preto). 2008;41(3):265-73.
2. Santos AAM, Verotti MP, Sanmartin JA. Importância do álcool no controle de infecções em serviço de saúde. *RAS*. 2002;4(16): 7-14.
3. Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic Susceptibility among

- Aerobic Gram-negative Bacilli in intensive Care Units in 5 European Countries. *J Amer Med Assoc*.1999;281(1):67-71.
4. Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho MMG. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(7): 2420-4.
 5. Pires, EJVC. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Rev Bras Ter Intens*. 2009;21(4):384-90.
 6. 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. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lei8080.pdf>
 7. Crabtree BF, Miller WL. Using Codes and Code Manuals: a Template Organizing Style of Interpretation. *In: Doing qualitative research in primary care: multiple strategies*. 2. ed. Newbury Park, CA: Sage Publications; 1999. p.163-177.
 8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p.87-90
 9. Weber DJ, Rutala WA. Use of germicides in the home and the healthcare setting: is there a relationship between germicide and antibiotic resistance? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27(10): 1107-19.
 10. Teixeira P, Valle S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1996.
 11. Food And Drug Administration – FDA. Tentative final monograph for health-care antiseptic drug products: proposed rule. *Federal Register*, 1994. p.31402-31452.
 12. Souza ELC. Comparação do dogluconato de clorexidina 0,12% com e sem xylitol para controle do biofilme oral e efeitos adversos associados. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Veiga de Almeida; 2007.
 13. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology. 9. ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology, 2007. p.1183-1185.
 14. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 42, de 25 de outubro de 2010. Dispõe sobre a obrigatoriedade de disponibilização de preparação alcoólica para fricção antisséptica das mãos, pelos serviços de saúde do País, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 out 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0042_25_10_2010.html
 15. Tortora GJ, Funke BR., Case CL. Microbiologia. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
 16. Roessler WG. Methods of Testing Antiseptics. *In: Block SS. Desinfecção, Esterilização e Preservação*. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p.100-106.
 17. European Standard, EN1040: Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants – Test method and requirements, 2005.
 18. Austrian Standards Institute. EN 14885: Chemical disinfectants and antiseptics: application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics. Wien; 2007.
 19. Hobson DW, Bolsen K. Methods of testing oral and topical antiseptics and antimicrobials. *In: Block SS. Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5. ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.1329-1358.
 20. AFNOR. Normes & Réglementation: Antiseptiques et Disinfectants. Paris: AFNOR, 1998.
 21. Brasil. Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. Controle de infecção hospitalar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF 13 mai 1998. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8c6cac8047457a6886d6d63fbc4c6735/PORTARIA+N%C2%B0+2.616,+DE+12+DE+MAIO+DE+1998.pdf?MOD=AJPERES>].
 22. Reis LM, Rabello BR., Ross C, Santos LMR. Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em serviço de saúde. *Rev Bras Enferm*. 2011; 64(5): 870-5.
 23. Atayese AO, Effedua HI, Oritogun KI, Kareem KT, Oluwadun A. Comparative study of the antimicrobial activity of chlorinated and non-chlorinated antiseptics against *C. albicans*. *Acad Arena*. 2010;2(9):35-40.
 24. Foster JSH. Preservation of ophthalmic solutions. *Manufact Chem Aerosol News*. 1965;2:43-6.
 25. Balows A, Hausler, William J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1991.

Determinação da sensibilidade do teste de ELISA para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de águas brutas

Sensitivity of ELISA for detecting *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in raw waters samples

RIALA6/1569

Regina Célia Arantes STANCARI

Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Bauru, Instituto Adolfo Lutz. Rua Rubens Arruda, quadra 06, Centro, Bauru, CEP: 17015-110. E-mail: rstancari@ial.sp.gov.br

Recebido: 24.05.2013 - Aceito para publicação: 20.09.2013

RESUMO

Os métodos microscópicos para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* são dispendiosos e apresentam reprodutibilidade variável e baixa recuperação, porém a rigorosa padronização da técnica e o controle de qualidade nos testes de recuperação permitem sua utilização em amostras ambientais. Neste estudo foi determinada a sensibilidade do ELISA, analisando-se o limite de detecção. Ademais, foi verificada a viabilidade de utilizá-lo como teste de triagem nos locais em que os métodos microscópicos foram aplicados para confirmar a veiculação de oocistos e cistos íntegros, e que podem representar risco de transmissão da criptosporidiose e/ou giardíase. Os limites de detecção foram altos: 98 cistos e 3.492 oocistos. Do total de amostras ambientais analisadas, 20 % foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e nenhuma para *Giardia* spp.. Concluiu-se que ELISA não apresenta sensibilidade adequada como teste de triagem para a finalidade deste estudo, pois as amostras ambientais geralmente apresentam números de cistos e oocistos abaixo daqueles observados em amostras fecais infectadas, para as quais os kits de reagente ELISA foram validados. Além disso, as diluições das soluções estoques dos cistos e oocistos em água destilada podem ter resultado em condições de reações desfavoráveis e ter influenciado na sensibilidade do ELISA.

Palavras-chave. *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., ELISA, limite de detecção.

ABSTRACT

The microscopic methods for detecting *Cryptosporidium* and *Giardia* are expensive, and a variable reproducibility and a low recovery are found. Nevertheless, a rigorous technical standardization and a quality control in the recovery testing give support to use them for analyzing the environmental samples. This study determined the sensitivity of ELISA for analyzing *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in raw water samples. Also, it was investigated whether this assay could be used as a screening test for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw water samples; and to deduce the potential transmission of giardiasis and cryptosporidiosis from these specimens. The detection limits were high, being 98 cysts and 3.492 oocysts. Of the analyzed environmental samples, 20 % showed ELISA positive for *Cryptosporidium* spp., and none for *Giardia* spp.. Therefore, ELISA showed to be unsuitable to be used as screening assay, because in the environmental samples usually occur a lower numbers of oocysts and cysts than those regularly found in infected stool samples, for which these kits have been validated. Furthermore, the dilutions prepared from the stock solutions of cysts and oocysts in distilled water could have resulted in unfavorable reaction conditions, and it has affected the sensitivity of ELISA.

Keywords. *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., ELISA, detection limits.

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium e *Giardia* são protozoários patogênicos que parasitam o intestino do ser humano causando infecções que variam desde assintomáticas até doenças severas, podendo causar a morte, dependendo do estado imunológico do indivíduo¹.

Estes protozoários são veiculados pela água e seus oocistos e cistos, além de resistirem ao tratamento pelo cloro, desinfetante mais comumente utilizado pelas Estações de Tratamento de Água (ETAs)², podem vencer as barreiras físicas (filtração) destas instalações e contaminarem a água distribuída para a população¹.

A pesquisa e o monitoramento destes parasitas vêm ganhando importância nas últimas décadas em função dos surtos ocorridos ao redor do mundo e, no Brasil, a publicação da Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, traz a obrigatoriedade deste monitoramento nos mananciais que apresentarem médias geométricas anuais de *Escherichia coli* superiores a 1.000/mL, devendo o mesmo ser realizado por um período mínimo de dois anos³. Tal monitoramento é dificultado por questões metodológicas, pois os métodos atualmente disponíveis para esta pesquisa são considerados caros, trabalhosos, com reprodução variável e baixa recuperação⁴⁻⁶, mas a rigorosa padronização da técnica e a adoção de testes de recuperação de cistos e oocistos nas amostras ambientais possibilitam a obtenção de taxas de recuperação aceitáveis e a introdução dos mesmos na rotina dos laboratórios.

A metodologia imunoenzimática (ELISA) vem sendo utilizada como método alternativo para o diagnóstico de *Cryptosporidium* e *Giardia* por permitir a realização simultânea de um grande número de análises, tornando-se um método importante para a investigação de surtos e estudos epidemiológicos. Este método foi desenvolvido para pesquisa de antígenos destes protozoários em amostras fecais, porém alguns autores vêm tentando aplicá-lo em amostras ambientais⁷. Ele se baseia na formação do complexo antígeno-anticorpo monoclonal imobilizado na placa de ELISA e, após a formação desse complexo, um anticorpo policlonal (anticorpo detector) ligado a uma enzima é adicionado, o qual se liga ao complexo antígeno-anticorpo, formado anteriormente. A adição de um substrato para a enzima unida ao anticorpo policlonal desenvolve uma coloração que é avaliada visualmente ou medida em espectrofotômetro, em determinado comprimento de onda.

O presente estudo procurou verificar a viabilidade do método de ELISA ser aplicado como

teste de triagem, pois este consegue detectar também antígenos de *Cryptosporidium* e *Giardia* livres e dispersos na água. Para tal, foi determinada a sensibilidade de kits imunoenzimáticos comerciais para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e pesquisada a ocorrência destes protozoários em amostras de água bruta de alguns municípios abrangidos pelo Grupo de Vigilância Sanitária XV (GVS - XV) de Bauru, no estado de São Paulo, Brasil. O teste de triagem seria utilizado para indicar onde aplicar ensaio microscópico por imunofluorescência, considerando que, em amostras ambientais, as formas infectantes íntegras destes protozoários podem estar dispersas e, geralmente, em quantidade bem inferior à das fezes.

MATERIAL E MÉTODOS

Região de estudo

O GVS - XV compreende 38 municípios dos quais dois têm captação de água exclusivamente superficial, nove contam com captação mista (rios e poços/minas) e os 27 restantes, captação subterrâneas (poços/minas). Foram selecionados para o presente estudo cinco municípios, sendo três com captação mista, um com superficial e um com subterrânea (minas). Outros critérios foram estabelecidos para a escolha das cidades, como a população e a importância econômica regional (para os de captação mista); tratamento convencional da água (captação superficial e mista); tratamento por filtração (captação subterrânea) e órgãos gestores do sistema de abastecimento vinculados às respectivas prefeituras.

Coleta da amostra

Foram coletadas dez amostras de água bruta em frascos de polietileno de 5 L, correspondendo duas amostras para cada um dos cinco municípios estudados. A primeira coleta foi realizada entre os meses de agosto e setembro de 2006 (1ª etapa - período seco) e a segunda entre janeiro e fevereiro de 2007 (2ª etapa - período chuvoso), observando-se a média dos índices pluviométricos destes municípios no período de 2001 a 2006.

Processamento da amostra

Foram filtrados 10 L de água bruta, em membrana de polycarbonato de 293 mm de diâmetro e 1 µm de porosidade, utilizando um sistema de filtração acoplado, por meio de mangueiras, a uma bomba de pressão positiva.

A eluição foi realizada adicionando-se 120 mL da solução de eluição (composta por Laureth a 10 %, Tris 1M, EDTA 0,5M e antifoam A) ao béquer contendo a membrana, seguido pela agitação em agitador de Kline por uma hora, com a rotação de 100 a 120 ciclos/minuto, transferindo-se este volume para tubo cônico de 250 mL. Foi realizado um segundo ciclo de agitação de 30 minutos após a adição de mais 120 mL de solução de eluição e complementada a limpeza da membrana com massageamento por dois minutos, lavagem em banho de ultrassom por dois minutos e novo massageamento. Este segundo volume da solução de eluição foi transferido para o mesmo tubo cônico utilizado inicialmente. A concentração foi realizada por centrifugação em 1.100 x g, por 20 minutos, até a obtenção do sedimento, e o sobrenadante foi aspirado até o volume de 5 mL. Este sedimento (amostra concentrada) foi utilizado na reação imunoenzimática (ELISA).

Método de ELISA

As reações de ELISA para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits, respectivamente, kit *Giardia* II, marca TechLab, lote 0705031, e kit *Cryptosporidium* test marca TechLab, lote 1005046, ambos para 96 reações e custo de R\$ 1.150,00 cada. Foram utilizados, em cada reação de ELISA, 50 µL e 100 µL das amostras concentradas para a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente.

Para a interpretação dos resultados foi considerado o seguinte padrão de leitura, preconizado pelo fabricante dos kits – Leitora bicromática ($\lambda = 450/620$ nm): DO < 0,090 – reação negativa e DO \geq 0,090 – reação positiva.

Local das análises

As análises foram realizadas na Seção de Microscopia Alimentar do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Centro de Laboratório Regional de Bauru.

Sensibilidade dos kits de ELISA

Para a determinação da sensibilidade dos kits de ELISA, suspensões estoques de *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino, adquiridas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e de *Giardia duodenalis*, adquiridas da Fundação da Universidade Federal do Paraná (FUNPAR), foram

contadas em câmara de Neubauer e realizadas diluições, em água destilada, de maneira que as alíquotas utilizadas nas reações (100 e 50 µL, respectivamente) contivessem um número determinado e conhecido de oocistos e cistos. Em seguida, a metodologia foi aplicada seguindo os procedimentos das instruções dos fabricantes dos kits.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de sensibilidade dos Kits de ELISA para cistos e oocistos são apresentados na Tabela 1.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que os limites de detecção foram altos e, assim, somente em águas com altas densidades de cistos e oocistos seria possível encontrar os parasitas. Porém a concentração esperada para amostras ambientais é muito menor do que a observada em amostras fecais, além disso, estes protozoários estariam, teoricamente, dispersos na água do manancial, necessitando de concentração de grandes volumes da amostra.

Segundo o fabricante do kit para pesquisa de *Cryptosporidium*, são necessários 1.250 oocistos por poço da placa de ELISA (em amostras fecais) para que comece a ocorrer a positividade da reação. Como no presente estudo foi encontrado um número muito maior de oocistos para iniciar a positividade, novos estudos devem ser realizados para verificar os fatores que estariam provocando este resultado. Como os kits foram desenvolvidos e validados para amostras fecais, um destes fatores pode ter sido a diluição das soluções estoques de oocistos em água destilada, o que pode ter provocado condições desfavoráveis de reação e a interferência na determinação do limite de detecção.

Sales⁷ cita que, pelos resultados obtidos em seu estudo, o método de ELISA poderia ser utilizado como teste de triagem em amostras ambientais, porém, no presente estudo, devido ao elevado limite de detecção e ao pequeno número de amostras ambientais estudadas, esta conclusão ficou prejudicada.

A vantagem da utilização do método de ELISA é que os oocistos e cistos não precisam estar íntegros para que haja positividade na reação. Os antígenos liberados da parede desses protozoários podem formar o complexo antígeno-anticorpo e, assim, é possível detectar os parasitas, mesmo quando estes estejam degenerados pelo estresse ambiental ou pelas injúrias das diversas etapas do método de isolamento (filtração, tratamento químico

Tabela 1. Valores de densidades ópticas (DO) obtidas para suspensões de cistos e oocistos de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum* e resultados do teste ELISA

Suspensão estoque de oocistos (**) (X σ e RSD)	Cistos inoculados	ELISA		Suspensão estoque de oocistos (**) (X σ e RSD)	Oocistos inoculados	ELISA	
		DO 450/620 nm	Resultados			DO 450/620 nm	Resultados
X1, σ1, RSD1	25	0,016	Negativo	X5, σ5, RSD5	809	0,006	Negativo
X2, σ2, RSD2	51	0,044	Negativo	X6, σ6, RSD6	1117	0,014	Negativo
X3, σ3, RSD3	74	0,044	Negativo	X6, σ6, RSD6	1552	0,031	Negativo
X4, σ4, RSD4	98	0,196	Positivo	X6, σ6, RSD6	2060	0,036	Negativo
X4, σ4, RSD4	98	0,189	Positivo	X6, σ6, RSD6	2540	0,050	Negativo
X2, σ2, RSD2	103	0,126	Positivo	X6, σ6, RSD6	2540	0,052	Negativo
X4, σ4, RSD4	118	0,292	Positivo	X6, σ6, RSD6	2940	0,042	Negativo
X4, σ4, RSD4	118	0,282	Positivo	X6, σ6, RSD6	2940	0,061	Negativo
X4, σ4, RSD4	147	0,373	Positivo	X6, σ6, RSD6	3492	0,100	Positivo
X4, σ4, RSD4	147	0,356	Positivo	X6, σ6, RSD6	3492	0,151	Positivo
X4, σ4, RSD4	196	0,412	Positivo	X6, σ6, RSD6	3725	0,151	Positivo
X2, σ2, RSD2	206	0,285	Positivo	X6, σ6, RSD6	5587	0,152	Positivo
X3, σ3, RSD3	247	0,142	Positivo	X6, σ6, RSD6	5587	0,171	Positivo
X1, σ1, RSD1	250	0,132	Positivo	X6, σ6, RSD6	5587	0,097	Positivo

X = média

σ = desvio padrão

RSD = desvio padrão relativo

(*) *Giardia duodenalis*: X1= 260.000; σ1= 25.981; RSD1= 10,0 %
 X2= 124.000; σ2= 18.422; RSD2= 14,9 %
 X3= 58.750; σ3= 8.624; RSD3= 14,6 %
 X4= 47.143; σ4= 5.850; RSD4= 12,4 %

(**) *Cryptosporidium parvum*: X5= 422.500; σ5= 30.822; RSD5= 7,3 %
 X6= 223.500; σ1= 13.838; RSD= 6,2 %

e centrifugação), o que não ocorre com os métodos microscópicos, em que os oocistos e cistos precisam estar íntegros para serem considerados positivos na observação microscópica.

A Tabela 2 apresenta os resultados das amostras de água bruta coletada nos cinco municípios estudados.

Considerando-se como positivas as amostras que apresentaram leituras de densidade óptica (DO) $\geq 0,090$, obteve-se para *Cryptosporidium* 20 % de amostras positivas, nos mananciais dos municípios V (1ª etapa – período seco) e III (2ª etapa – período chuvoso). Quanto aos cistos de *Giardia*, todas as amostras foram negativas pelo ELISA.

Neste caso, o ensaio microscópico (monitoramento) deveria ser realizado nestes municípios para verificar a ocorrência de oocistos íntegros, o que representaria um risco em potencial para a saúde da população.

Siddons et al⁴, ao comparar resultados de amostras inoculadas com oocistos, verificaram que não existe uma concordância entre os métodos microscópicos e imunológicos e atribuem isso ao fato de que este último pode detectar tanto oocistos íntegros quanto antígenos livres e não sofrer interferências dos resíduos presentes nos sedimentos das amostras ambientais após sua concentração.

Sales⁷ analisou 90 amostras de água tratada, utilizando coloração histoquímica (Kinyoun) e métodos imunológicos (ELISA e Imunofluorescência direta) para a detecção de *Cryptosporidium* e encontrou 52,22 % das amostras com estruturas álcool-ácido resistentes, sendo que 15,55 % das amostras foram confirmadas nos testes imunológicos (13 amostras no teste de ELISA e 7 na imunofluorescência). Verificou que houve uma correlação positiva entre o ELISA e a imunofluorescência, em que

46,1 % das amostras positivas no ELISA foram positivas com a imunofluorescência. Concluiu que a metodologia imunoenzimática ELISA poderia ser utilizada como teste alternativo em amostras ambientais. No presente estudo, devido ao pequeno número de amostras avaliadas, à pequena porcentagem de amostras positivas e aos limites de detecção obtidos para estes parasitas, não é possível afirmar com segurança que este método pode ser aplicado na detecção destes protozoários em amostras ambientais.

Tabela 2. Valores de densidade óptica (DO) obtidos pelo método de ELISA para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água bruta

Municípios	Período	DO 450/620 nm	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
I	Seco	SR	0,069
II	Seco	0,010	0,010
III	Seco	0,049	0,019
IV	Seco	0,010	0,014
V	Seco	0,117	0,028
I	Chuvoso	0,085	0,014
II	Chuvoso	0,016	0,020
III	Chuvoso	0,112	0,011
IV	Chuvoso	0,089	0,060
V	Chuvoso	0,021	0,070

SR – Sem resultado

Michel e colaboradores compararam um teste de aglutinação (*co-agglutination test*) com os métodos de ELISA e Kinyoun para a confirmação de *Cryptosporidium* em fezes, soro e amostras ambientais e, como resultado, obtiveram que o teste de aglutinação e o ELISA detectaram a presença do parasita em amostras de água que foram negativas na coloração de Kinyoun, fato atribuído à baixa concentração de oocistos (necessários para positividade em ensaios microscópicos) ou à presença de antígenos solúveis liberados da parede dos oocistos degenerados.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que, devido aos altos limites de detecção obtidos no presente estudo, o método de ELISA não seria um bom teste de triagem para a pesquisa destes protozoários em águas e que, embora apresente limitações, o método microscópico preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1623.1) deve ser adotado para o monitoramento das amostras ambientais, sendo também útil a ferramenta de biologia molecular (PCR) para o estudo da epidemiologia destes parasitas.

REFERÊNCIAS

1. Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. *Rev Panam Infectol*. 2007;9(4):36-43.
2. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts. *Water Res*. 2004;38:818-62.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 2914, 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 I, p.39-46.
4. Siddons CA, Chapman PA, Rush BA. Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in feces and environmental samples. *J Clin Pathol*. 1992;45:479-82.
5. Cantusio Neto R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
6. Francy DS, Simmons OD, Ware MW, Granger EJ, Sobsey MD, Schaefer FW. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl Environm Microbiol*. 2004;70(7):4118-28.
7. Sales TFSM. Detecção de enteroparasitas e organismos do zooplâncton em água de consumo humano: risco à saúde pública [dissertação de mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
8. Michel MY, Khalifa AM, Ibrahim JR. Detection of *Cryptosporidium parvum* antigen by co-agglutination test and ELISA. *East Medit Health J*. 2000;6(5/6):898-907.

Microbiological quality of finger food and snacks

Qualidade microbiológica de lanches e salgados

RIALA6/1570

Sarah Hwa In LEE^{1*}, Carlos Henrique CAMARGO^{1,2}, Elisângela de Souza MIRANDA¹, Ary FERNANDES JUNIOR¹, Vera Lúcia Mores RALL¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP - Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, S/N. CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brasil. E-mail: sarah.hwa.in.lee@gmail.com

²Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 13.03.2013 - Aceito para publicação: 06.08.2013

ABSTRACT

Although finger food is convenient, it may be easily contaminated from the stage of preparation to the moment of consumption. This study aimed at evaluating the microbiological quality of finger food and sandwiches sold in Botucatu – SP, Brazil, by following the standards established by the Brazilian Health Surveillance Agency, ANVISA. The analysis was conducted according to APHA. A hundred and twenty-two samples of meat, chicken, shrimp, cheese, and vegetable finger food and sandwiches were tested from August 2008 to March 2009. Seventeen (13.9 %) samples of meat, cheese, vegetables and chicken were in disagreement with the ANVISA standards — some of them in more than one parameter. High counting of thermotolerant coliforms and coagulase-positive staphylococci were found in ten (8.2 %) and eight (6.5 %) samples, respectively. *Salmonella* spp. was detected in two samples (1.6 %). No *Bacillus cereus* and sulfite-reducing clostridia were isolated. Although only 10 samples (8.2 %) showed pathogenic bacteria contamination, these results are relevant, since they indicate that the population is generally exposed to risks of acquiring foodborne diseases. Thus, the sanitary authorities might implement actions for supervising the quality of the food sold in Botucatu, and to strengthen the food sellers to improve the hygienic conditions and be aware of the risks of food contamination.

Keywords. food quality, finger food, CPS, pathogenic bacteria, ready-to-eat food, snacks

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a qualidade microbiológica de salgados e sanduíches comercializados em Botucatu-SP, seguindo-se a legislação em vigor. As análises foram realizadas de acordo com APHA. Foram analisadas 122 amostras de salgados de carne, frango, camarão, queijo e vegetais, e sanduíches no período de agosto/2008 a março/2009. Dezesete (13,9 %) amostras de carne, queijo, vegetais e frango, e em algumas em mais de um parâmetro, estavam em desacordo com a legislação em vigor. Foram detectadas elevadas contagens de coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase-positiva, respectivamente, em dez (8,2 %) e oito (6,5 %) amostras. *Salmonella* spp. foi isolada em duas amostras (1,6 %). As contagens de *Bacillus cereus* e de Clostrídio Sulfito Redutor não ultrapassaram os padrões da legislação. A maioria dos salgados mostrou resultados dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. A presença de bactérias patogênicas como *S. aureus* e *Salmonella* spp. foi demonstrada em 10 amostras (8,2 %); e este resultado é relevante, pois indica que a população está exposta a riscos de doenças veiculadas por alimentos. Torna-se necessário colocar em prática a vigilância dos alimentos comercializados em Botucatu, incentivar a melhoria de condições de higiene pelos comerciantes, e ter ciência dos riscos e das implicações da contaminação microbiológica dos alimentos.

Palavras-chave. qualidade de alimentos, lanches, ECP, bactérias patogênicas, alimentos prontos para consumo, salgados.

INTRODUCTION

The choice for quick meals out of the house was stimulated by the insertion of women into labor market and by the lack of time either to go home to eat or to prepare a meal. This situation resulted in an increased number of people who eat snacks or fast food commercialized near their employment place.

Microbiological contamination may come from the raw food or occur at preparation, storage or the moment of consumption. Eggs, chicken and meat are the most commonly contaminated foods¹. During preparation, cross-contamination can occur either due to the use of poorly sanitized kitchenware or kitchen equipment, or due to negligence or ignorance of the food handler regarding the use of gloves or mob-caps, hand asepsis, and good handling practices. Transmission of enteric pathogens and other microbial hazards to ready-to-eat foods through air, contaminated utensils and food contact surfaces has also been widely reported, so attention should be paid to food hygiene and compliance with the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system in order to prevent foodborne illness outbreaks².

Contamination with microbes or their toxins is a particularly important problem, causing at least 48 million illnesses annually in the United States and, likely, hundreds of millions globally³. It is known that often the causative agent of foodborne diseases is not identified⁴. In addition, it is known that outbreak cases are underestimated, because most cases are not notified to the Brazilian health authorities. Some outbreaks, however, were sporadically reported in Brazil^{5,6}.

Besides the natives, Botucatu receives about 550 new students every year, due to the presence of a university. Almost all of these students live in Fraternity or Sorority houses and do not cook due to the lack of time. Thus, they usually eat ready to eat foods or fast meals that are cheap and tasty⁷.

The aim of this study was to evaluate the microbiological safety of finger foods and sandwiches commercialized in Botucatu snack bars, street vendors, groceries and convenience stores, according to the Brazilian food sanitation standards established by ANVISA⁸.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

Sixty-one groceries, cafes, food trailers, snack bars, bakeries and street vendors located in

important areas in Botucatu, SP, were analyzed two times, between August 2008 and March 2009. Samples of meat, chicken, shrimp, cheese, vegetable finger food and sandwiches were collected. All temperature conditions for food storage were adequate except for 2 snack bars. Samples were transported in sterile plastic bags (114 x 229 mm - Inlab), under refrigeration, in a cooler box until processing at the lab on the same day.

Microbiological Analysis

According to APHA⁹ protocols, 25 g of food were homogenized in 225 mL of peptone water in plastic bags at Stomacher (Lab Blender 400) for 30 seconds. Other dilutions were made from this 10⁻¹ dilution.

All culture media were obtained from Difco, Becton Dickinson (Sparks, MD). Determination of most probable number (MPN) of thermotolerant coliform (TC) was performed using technique of multiples tubes⁹.

Coagulase-positive staphylococci (CPS) were detected and identified according to Lancette and Bennett⁹ by spread plating an appropriate dilution (0.1 mL) onto Baird Parker agar plate, incubating at 35 °C/48 h. Black colonies with 2 halos were presumptive of CPS. Such presumptive strains were confirmed by catalase, coagulase, TNase and the "Dry Spot Staphytest Test" (Oxoid). Acetoin production (Voges-Proskauer) and β-galactosidase tests were performed in order to separate *S. aureus* from *S. intermedius*.

The detection protocol employed for *Salmonella* spp. was described by APHA⁹. Thus, 25 g of food were homogenized in a Stomacher (Lab-Blender 400) with 225 mL buffered peptone water. After incubation at 35 °C/24 h, 1 mL was inoculated in 10 mL of tetrathionate broth (35 °C/24 h) and 0.1 mL in 10 mL Rappaport Vassiliadis (42 °C/24 h). After incubation, a loopful of each suspension was plated onto xylose-lysine-desoxycholate agar and *Salmonella-Shigella* agar. After incubation at 35 °C/24 h, five typical colonies from each agar plate were biochemically tested, using triple sugar iron agar and the API 20E test kit (bioMérieux). The colonies were also submitted to serological tests, using polyvalent somatic and flagellar antisera (Probac).

Enumeration of sulfite-reducing clostridia (SRC): using the spread plate method, 0.1 mL serial dilutions was plated onto Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) agar plates, incubated under anaerobic atmosphere in a jar with atmosphere generation system (Anaerogen/

Oxoid), at 46 °C/48 h. Plates showing between 25 and 250 black and small colonies were chosen for enumeration⁹.

For *Bacillus cereus* group detection, spread method was also used in Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar at 35 °C/24 h. Typical colonies, rough and dry with bright pink background surrounded by an egg yolk precipitate, were transferred to Tryptic Soy Agar (TSA) and further confirmed by biochemical characterization².

Microbiological Parameters

ANVISA⁸ legislation RDC no. 12 determines the following parameters to cakes and similar food, either sweet or salty, with or without filling, and finger food in general: maximum score of 10³ CFU/g for coagulase positive staphylococci, *B. cereus* and sulfite-reducing clostridia, 10² MPN/g for thermotolerant coliforms and absence of *Salmonella* in 25 g.

RESULTS AND DISCUSSION

Overall, according to ANVISA⁸ RDC no. 12, 13.9 % of the samples were in disagreement with those established standards. Most of the samples in disagreement were chicken, meat, cheese and vegetable, from the highest value to the lowest. It is possible to notice in Table 1 that the total number is higher, but there were some samples with more than one parameter in disagreement. The values can be observed in Table 1.

It is important to notice that in 3 samples the values of two of the parameters were exceeded. Two samples of chicken finger food exceeded in thermotolerant coliform values and had *Salmonella* spp. at the same time. One sample of cheese finger food exceeded in thermotolerant

coliform and Coagulase-positive staphylococci values.

Finger food and sandwiches generally hold potential health risks associated with initial contamination of raw food by pathogenic bacteria, as well as contamination by handler during the preparation and through post-cooking handling, besides cross-contamination. Microbiological load in snacks in the developing world is highly dependent on the raw ingredients, traditional methods of processing and packaging, and maintaining temperature, which can determine the rate of deterioration of the ready-to-eat food products and snack foods¹⁰. Also, many of the facilities were not clean, which can reflect in food quality. The risk of contamination is much higher when vendors wear dirty uniforms.

We are aware that foodborne illness caused by microorganisms is a major international health problem associated with food safety in developing countries. Contamination of street food has been attributed to exposure to polluted environment, poor sanitation and poor hygienic practices by the vendors.

Even though the São Paulo state health surveillance authority (Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo¹¹) requires that the center of fried finger food reaches at least 74 °C during preparation, one seller said that, in order to be crispy, the temperature inside does not reach that values; thus, potential pathogens are not eliminated. Chicken finger food is a good example, because poultry is manipulated after it has been cooked, when it is wrapped in dough and fried later on. *Salmonella* spp. is thermosensitive, being eliminated at 65 °C, after 15 minutes. We found *Salmonella* spp. in a fried

Table 1. Microbiological results of 122 finger food and sandwiches retailed in Botucatu, SP

Sample of finger food or sandwich	N*	Thermotolerant coliform	Coagulase-positive staphylococci	<i>B. cereus</i>	Sulfite-reducing clostridia	<i>Salmonella</i> spp.
		n (%)**	n (%)**	n (%)**	n (%)**	n (%)***
Sandwich	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chicken	44	3 (6.8)	5 (11.3)	0 (0)	0 (0)	1 (2.3)
Vegetable	5	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cheese	34	2 (5.9)	2 (5.9)	0 (0)	0 (0)	1 (2.9)
Meat	33	4 (12.1)	1 (3.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Shrimp	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	122	10 (8.2)	8	0	0 (0)	2

*number of samples analyzed; **number and percentage of samples above the limit; ***number and percentage of positive samples

finger food with cheese and chicken filling. There is a positive correlation between long holding times at room temperature and high bacterial counts¹². It was observed that in 2 snack bars, the heater was turned off in order to save energy, and we isolated *Salmonella* spp. from the snacks sold in those places. This type of food has to be kept at temperatures above 65 °C, to avoid bacterial growth or toxin production. Reheating previously cooked foods increased the risk of *Salmonella* spp. contamination. Snacks and sandwiches are generally prepared in the early morning; they are stored at room temperature and frequently are not separated from raw chicken and vegetables⁴. Therefore, it is crucial to avoid any recontamination.

In similar studies^{5,13,14}, this bacteria was not found, which indicates a low prevalence of *Salmonella* spp. in this kind of food, but when it is present, it represents a risk for the consumer. Salmonellosis is usually acquired by ingestion of contaminated water or food, and poultry products are a major source of *Salmonella* spp. in many developing countries.

Brazilian legislation provides regulation of microbiological standards for different kinds of food⁸. Above these limits, the food is considered improper to consume. Thermotolerant coliform indicates the hygiene and sanitization conditions the product underwent and shows possible fecal contamination and presence of pathogens.

We found 8.2 % of samples with thermotolerant coliform beyond the limit considered safe by ANVISA. Almeida et al¹ reported that the frequency of fecal contamination of street foods in other Latin American cities ranged from 9.4 % to 56.7 % above the standard, being considered of unsatisfactory hygienic condition. Furlaneto et al¹⁴ found 70 % of samples presenting thermotolerant coliform beyond the limit; Hanashiro et al⁷, in a study conducted in São Paulo, found 30 % of the samples containing thermotolerant coliform beyond the limit and Curi¹³ did not find any improper food in another study in Brazil. The presence of thermotolerant coliforms in the samples indicates a high risk that other pathogenic organisms have also contaminated the food⁷.

Coagulase-positive staphylococci enumeration beyond the established limit was found in 8 (6.5 %) samples. Furlaneto et al¹⁴ found similar value, with 10 % of contamination. Higher numbers were observed by Rodrigues et al⁶ and Curi¹³, of 37 % and 34 %, respectively.

The presence of high quantity of CPS indicates lack of hygiene on the preparation, bad manipulation, improper cooking and maintenance of the food.

None of *Bacillus cereus* or sulfite-reducing clostridia count from our samples exceeded the limit established by ANVISA. Curi¹³ also did not find any samples with *B. cereus* and SRC counting exceeding the recommended limit. SRC is commonly isolated from pasture soil and from the digestive tract of healthy animals. Hanashiro et al⁷ isolated *B. cereus* in 12.5 % of the samples, which may be considered low comparing to studies around the world.

Although this study brings up some important information regarding the ready-to-eat food commercialized as snacks and sandwiches, it has some limitation. Nevertheless, this work showed that consumers should be aware and look for quality.

CONCLUSION

The results show that most of the samples were in accordance with the microbiological standards established by ANVISA. However, 8.2 % of them had pathogens such as *S. aureus* and *Salmonella* spp., exposing population to risks. Considering the data reported in this study, we present some suggestions for improving the microbiological quality of ready-to-eat food sold in Botucatu: educational and training programs for vendors; improvement of vendors' equipment for preparation and storage; adequate sanitation and refuse disposal facilities; and also adoption of the HACCP system.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the research fellowship support provided to the student Sarah Hwa In Lee.

REFERENCES

1. Almeida CF, Araújo ES, Soares YC, Diniz RFC, Fook SML, Vieira KVM. Epidemiological profile of food intoxication reported by the Poisoning Information Center of Campina Grande, Paraíba. *Rev Bras Epidemiol*. 2008;11:139-46.
2. Lund BM, O'Brien SJ. Microbiological safety of food in hospitals and other healthcare settings. *J Hosp Infect*. 2009;73:109-20.
3. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States — Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):7-15.
4. Cardinale TE, Gros-Claude PJD, Tall F, Guèye EF, Salvat G. Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended

- poultry dishes in Dakar, Senegal. *Int J Food Microbiol*. 2005;103:157-65.
5. Caetano VC, Saltini DA, Pasternak J. Surto de salmonelose por *Salmonella enterica* em profissionais de saúde, causado por alimentos consumidos em uma festa de ano novo realizada dentro da Unidade de Terapia Intensiva. *Einstein*. 2004;2:33-5.
 6. Rodrigues KL, Moreira NA, Almeida ATS, Chiochetta D, Rodrigues MJ, Brod CS, et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Cienc Rural*. 2004;34(1):297-9.
 7. Hanashiro A, Morita M, Matté GR, Matté MH, Torres EAFS. Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. *Food Control*. 2004;16:439-44.
 8. 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 União*. 10 jan 2001. Seção 1:45-53.
 9. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. Washington (DC): American Public Health Association; 2001.
 10. Ezekiel CN, Anokwuru CP, Fari A, Olorunfemi MF, Fadairo O, Ekeh HA, et al. Microbiological quality and proximate composition of peanut cake (*Kulikuli*) in Nigerian markets. *Acad Arena*. 2011;3(4):103-11.
 11. Centro de Vigilância Sanitária. Portaria CVS-6/99, de 10 de março de 1999. Aprova Regulamento Técnico, que estabelece os Parâmetros e Critérios para o Controle Higiênico-Sanitário em Estabelecimentos de Alimentos. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*. 10 mar 1999.
 12. Bryan FL. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J Food Prot*. 1988;5:663-73.
 13. Curi JDP. Condições microbiológicas de lanches (cachorro quente) adquiridos de vendedores ambulantes, localizados na parte central da cidade de Limeira, SP [dissertação de mestrado]. Piracicaba (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
 14. Furlaneto L, Kataoka AF. Análise microbiológica de lanches comercializados em carrinhos de ambulantes. *Lecta*. 2004;22:49-52.

Uso de ultrassom associado ou não ao dicloisocianurato de sódio na sanitização de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*)

Use of ultrasound associated or not with sodium dichloroisocyanurate in the disinfection of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*)

RIALA6/1571

Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ^{1*}, Hiasmyne Silva de MEDEIROS²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Educação Integrada em Saúde, Curso de Nutrição, Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Marechal Campos, n.1468, CEP 29043-910, Vitória, ES - Brasil. Tel.: (27) 3335-7222 .
E-mail: jackline.jose@ufes.br

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
Recebido: 04.01.2013 - Aceito para publicação: 30.09.2013

RESUMO

A operação de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa na qual pode ser alcançada a redução no número de micro-organismos deterioradores e patogênicos. Nesta pesquisa foi avaliada a aplicação do ultrassom associado ou não ao dicloroisocianurato de sódio na etapa de sanitização de tomates do tipo cereja. O tratamento por ultrassom combinado à solução de dicloisocianurato de sódio e o procedimento com inicial aplicação de ultrassom seguido de imersão em solução do composto clorado, foram os que promoveram as maiores reduções na microbiota inicial de mesófilos aeróbios e coliformes a 35 °C. Em todos os tratamentos, não houveram alterações significativas nos valores de sólidos solúveis, pH e acidez titulável ($p < 0,05$). Os tratamentos com ultrassom promoveram 14 % de redução na firmeza do tomate cereja não sanitizado. Pelo fato de o ultrassom ser potencial alternativa na sanitização, outras variáveis do tratamento (tempo e frequência aplicada) devem ser estudadas para adequar as condições de processamento que potencializem a inativação de micro-organismos sem causar prejuízos na qualidade final do produto.

Palavras chave. ultrassom, sanitização, hortaliças.

ABSTRACT

The washing procedure associated with the use of sanitizer solutions is the only one stage in which the reduction in the number of deteriorative and pathogenic microorganisms can be achieved. This study aimed at evaluating the application of the ultrasound associated with or without the sodium dichloroisocyanurate on the cherry tomatoes sanitization step. The ultrasound treatment combined with sodium dichloroisocyanurate solution, and the procedure in which the ultrasound was applied at first and followed by the immersion in chlorinated solution, was the procedure that promoted the highest reductions in the initial aerobic mesophilic microorganisms and coliforms at 35 °C. No significant changes was found ($p < 0.05$) on the soluble solids, pH and titratable acidity values in all of the used treatments. The treatments with ultrasound promoted 14 % reduction in the firmness of not sanitized tomato. As a potential alternative for performing the sanitization, the ultrasound should be assessed on the additional variables as the applied time and frequency. Therefore, the processing conditions would be adjusted, and it would enhance the microorganisms inactivation without causing harm on the quality of final product.

Keywords. ultrasound, sanitization, vegetables.

INTRODUÇÃO

O tomateiro é a segunda hortaliça cultivada no mundo, sendo sua quantidade produzida superada apenas pela batata¹. O Brasil está entre os 10 maiores países produtores de tomate, com produção total da ordem de 3,887 milhões de toneladas em 2008 e com área de produção de 61 mil hectares². Entre as diversas variedades de tomate, o tomate do tipo cereja tem crescido em importância nos mercados das grandes cidades³. O tomate do tipo cereja tem sido escolhido por restaurantes por serem pequenos e delicados, além de ter tamanho reduzido, o que permite redução no desperdício⁴. Esta hortaliça apresenta valor nutritivo muito elevado e, aliado ao fato de ser bastante consumida, a cultura é uma das principais fontes de vitaminas e sais minerais em muitos países⁵.

Alguns micro-organismos, como *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Aeromonas* e o vírus da Hepatite A, vêm sendo associados a surtos causados pela ingestão de alimentos, como frutas e hortaliças contaminadas, e indicam a importância do controle microbiológico para a saúde pública⁶.

A operação de lavagem combinada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa para redução no número de micro-organismos deterioradores e patogênicos. Dentre os sanitizantes empregados na indústria de alimentos, principalmente em produtos frescos, a maioria é à base de cloro e compostos clorados⁷. As concentrações recomendadas de cloro residual livre para a sanitização de frutas e hortaliças variam de 50 a 200 mg.L⁻¹ em um tempo de contato de 1 a 30 minutos⁷. Entretanto, em condições típicas de lavagem de frutas e hortaliças na cadeia de processamento mínimo, a eficiência do cloro em reduzir a contaminação por patógenos é limitada, alcançando a proporção de um a dois ciclos logarítmicos na população de micro-organismos^{8,9}.

O ultrassom é uma tecnologia recomendada na indústria de alimentos com diferentes aplicações, dentre elas, a remoção de partículas aderidas a superfícies e a inativação de micro-organismos. Essa inativação é consequência do processo de cavitação, que consiste de formação, crescimento e colapso de bolhas, que geram uma energia mecânica e química localizada. Quando o ultrassom é empregado associado com agentes químicos como Cl₂, H₂O₂, O₃, o intenso gradiente de pressão permite a penetração desses agentes oxidantes, o que

permite aumentar a eficiência dos sanitizantes químicos¹⁰. Esta estratégia pode colaborar para o tratamento de frutas e hortaliças minimamente processadas e, assim, auxiliar na adaptação às novas tendências do mercado. Portanto, considerando a importância do estudo da eficiência da aplicação do ultrassom combinado ou não com sanitizantes, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o uso desta tecnologia na etapa de sanitização de tomate cereja.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da amostra e sanitização

Os tomates cereja, *in natura*, foram adquiridos em um mercado varejista em Viçosa, Minas Gerais, e armazenados a 10 °C até a sanitização. A hortaliça foi selecionada, lavada e submetida aos tratamentos de sanitização. Foram realizados os seguintes tratamentos: 200 mg.L⁻¹ de cloro residual total (CRT), em pH 6,1, preparada a partir de dicloisocianurato de sódio comercial, ultrassom com frequência de 40 Khz, ultrassom aplicado em associação à 200 mg.L⁻¹ de CRT, e aplicação de ultrassom por 10 min seguida de uso de solução do composto clorado nas condições descritas anteriormente. Os três primeiros tratamentos foram realizados por 10 min. Além dos tratamentos de sanitização, fez-se também a avaliação de amostras não tratadas (controle sem sanitizar).

Posteriormente, os tomates foram drenados e armazenados em recipientes de polipropileno a 6 °C por 4 dias. Amostras foram retiradas em intervalos de dois dias para as análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

Para as análises de tomates cereja, amostras de 25 g foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1 %. A homogeneização foi feita em *stomacher* (Seward Medical Co., Londres, Reino Unido), por um minuto, em velocidade normal. Diluições decimais apropriadas foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios de cultura específicos para a determinação de cada grupo microbiano.

Para contagem padrão de mesófilos, foi realizada a semeadura em profundidade em Ágar Padrão para Contagem (PCA- Himedia®), com incubação por 48 h a 35 °C. Para contagem de fungos e leveduras, foi realizada a técnica de espalhamento em superfície em Ágar Batata Dextrose (BDA) (Himedia®), acidificado com solução de

ácido tartárico 10 %, esterilizada. A contagem de fungos e leveduras foi realizada após 5 a 7 dias de incubação a 25 °C. Para contagem de coliformes a 35 °C, foi utilizado o ágar MacConkey (Himedia®), com incubação por 48 h. Todas as análises microbiológicas foram realizadas segundo descrito na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹¹.

Análises físico-químicas

Acidez Titulável (AT)

O teor de ácidos não voláteis foi determinado por titulação com NaOH. Foram utilizadas 5 g de tomate cereja que foram homogeneizadas juntamente com 50 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se três gotas de indicador de fenolftaleína 1 %, procedendo-se às titulações, sob agitação, com solução de NaOH 0,1 N. Os resultados foram expressos em g de ácido por 100 g de tomate cereja, segundo AOAC¹².

pH

Para medição do pH foram tomados aleatoriamente 5 g de tomate cereja. As amostras foram homogeneizadas juntamente com 50 mL de água destilada, sendo feitas as leituras em pHmetro Digimed DM 20 (São Paulo, Brasil).

Teor de sólidos solúveis (TSS)

O teor de sólidos solúveis foi determinado por refratometria, utilizando refratômetro digital de bancada modelo ABBÉ. As leituras foram feitas com três gotas de suco da polpa, feito com 10 g de tomate cereja homogeneizadas em 100 mL de água destilada e os resultados expressos em °Brix.

Cor da epiderme

A mudança da cor da epiderme da hortalíça foi quantificada objetivamente por meio de colorímetro (COLORQUEST XE) com leitura direta de reflectância das coordenadas L (luminosidade), a (relativa de verde a vermelho) e b (relativa de amarela a azul). Para cada amostra, foi utilizada a média de três determinações em zonas aleatórias de cada hortalíça.

Firmeza

A firmeza da polpa dos tomates cereja foi determinada em aparelho de ensaio de materiais INSTRON (Série 3367) utilizando-se *probe* (3 mm de

diâmetro), velocidade 5 mm/s com uma distância de penetração de 19 cm.

Análises Estatísticas

O estudo foi conduzido em três repetições e os dados analisados no programa SAS, versão 9.1 (Statistical Analysis – SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) sendo realizado o teste de Tukey, considerando $p < 0,05$, para comparação do \log_{10} UFC.g⁻¹ médias contagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises microbiológicas

A contagem inicial de mesófilos aeróbios, coliformes a 35 °C e fungos filamentosos e leveduras foi em média de 5,65; 4,46 e 4,88 \log_{10} UFC.g⁻¹, respectivamente (Tabela 1). O tratamento ultrassom combinado à solução de dicloisocianurato de sódio e aquele em que foi aplicado primeiro o ultrassom seguido da imersão em solução com o composto clorado, foram as que promoveram as maiores reduções na microbiota inicial de mesófilos aeróbios e coliformes a 35 °C. Para fungos filamentosos e leveduras, destaca-se também o tratamento com solução de dicloisocianurato de sódio, que promoveu redução de cerca 2 \log_{10} UFC.g⁻¹.

Houve redução do número de microorganismos mesófilos aeróbios e coliformes 35°C no tomate cereja tratado somente com ultrassom ao longo do armazenamento. Entretanto, essa redução não foi significativa para coliformes a 35 °C ($p > 0,05$).

Análises físico-químicas

Os valores de AT, pH e TSS em todos os tratamentos não alteraram significativamente ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento. Os valores médios observados para o tratamento controle variou de 0,28 a 0,33, 4,05 a 4,15 e 7,50 a 8,30 para AT, pH e TSS, respectivamente.

TSS e AT são fatores críticos na determinação da qualidade e na aceitabilidade pelo consumidor de frutas e hortalíças¹³. Lu et al¹⁴ não verificaram alteração nos valores de pH de tomate cereja (tipo *grape*) tratados com microondas.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores dos índices de cor (*L a b*) e de firmeza da polpa (N) de tomate cereja durante o armazenamento a 6 °C. Observou-se diferença significativa para os tratamentos com ultrassom nos índices *L* e *a*. Lu et al¹⁴ não verificaram alterações nos parâmetros de cor após tratamento com microondas em tomate cereja.

Tabela 1. Efeito dos tratamentos de sanitização na microbiota de tomate cereja durante o armazenamento a 6 °C

Tratamento	Mesófilos Aeróbios (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)	Coliformes a 35 °C (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)	Fungos Filamentosos e Leveduras (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)
DIA 0			
Controle	5,65a	4,46a	4,88a
Cloro	4,79b	3,5ab	2,70d
Ultrassom	4,87b	3,2ab	3,26bc
Ultrassom + Cloro*	3,08bc	2,79c	2,10d
Ultrassom + Cloro **	3,96bc	2,74c	2,97bcd
DIA 2			
Controle	6,01a	4,31a	5,06a
Cloro	5,06b	4,08a	3,66bc
Ultrassom	4,32b	2,80c	3,95b
Ultrassom + Cloro*	3,67bc	3,03c	3,02bcd
Ultrassom + Cloro **	4,66b	3,22ab	3,31bc
DIA 4			
Controle	5,09a	3,35b	5,02a
Cloro	3,87bc	2,36c	3,63bc
Ultrassom	4,23b	2,17de	3,48bc
Ultrassom + Cloro*	2,98c	1,85d	1,67e
Ultrassom + Cloro **	2,39c	2,21de	2,00d

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não apresentaram diferença estatisticamente significativa, considerando $p < 0,05$. *Tratamento combinado de ultrassom 40 kHz e solução de dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹. ** Tratamento no qual submeteu-se a hortaliça à ação do ultrassom e em seguida foi imersa em solução de dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹

Tabela 2. Efeito dos tratamentos de sanitização nos valores dos índices de cor (L a b) e de firmeza da polpa (kg.cm⁻²) de tomate cereja durante o armazenamento a 6 °C

Tratamento	Cor L	Cor a	Cor b	Firmeza (N)	
DIA 0	Controle	30,10 ± 2,67a	7,41 ± 1,22a	11,07 ± 1,10a	2,16 ± 0,21a
	Cloro	29,89 ± 1,42a	7,54 ± 1,28a	10,81 ± 0,37a	1,54 ± 0,29d
	Ultrassom	30,94 ± 5,38a	4,12 ± 2,72ab	10,84 ± 1,03a	1,86 ± 0,20ab
	Ultrassom + Cloro*	29,13 ± 1,36a	5,91 ± 2,47ab	9,76 ± 0,67a	1,15 ± 0,14ef
	Ultrassom + Cloro **	15,32 ± 2,26b	15,74 ± 1,21c	7,91 ± 3,42a	1,11 ± 0,14f
DIA 2	Controle	30,08 ± 2,03a	8,88 ± 1,20a	11,56 ± 1,64a	2,04 ± 0,10ab
	Cloro	29,77 ± 1,24a	7,01 ± 0,471a	10,72 ± 0,62a	1,11 ± 0,55f
	Ultrassom	28,74 ± 2,39a	5,53 ± 1,579ab	13,47 ± 4,77a	1,57 ± 0,59ab
	Ultrassom + Cloro*	28,24 ± 1,52a	6,02 ± 0,915ab	9,32 ± 1,01a	1,35 ± 0,17e
	Ultrassom + Cloro **	20,96 ± 3,34b	11,49 ± 1,837c	8,36 ± 1,59a	1,39 ± 0,11d
DIA 4	Controle	29,97 ± 0,83a	8,90 ± 1,67a	11,19 ± 1,75a	1,89 ± 0,23ab
	Cloro	29,77 ± 0,98a	6,49 ± 0,94a	10,41 ± 1,29a	2,10 ± 0,21a
	Ultrassom	28,96 ± 1,65a	5,51 ± 0,95b	10,27 ± 1,83a	1,61 ± 0,19bc
	Ultrassom + Cloro*	27,24 ± 0,61a	6,21 ± 1,81ab	9,28 ± 1,42a	1,32 ± 0,28e
	Ultrassom + Cloro **	28,68 ± 0,96a	6,83 ± 2,85ac	9,00 ± 1,43a	1,58 ± 0,14c

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não apresentaram diferença estatisticamente significativa, considerando $p < 0,05$. *Tratamento combinado de ultrassom 40 kHz e solução de dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹. ** Tratamento no qual submeteu-se a hortaliça à ação do ultrassom e em seguida foi imersa em solução de dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹

No presente trabalho, verificaram-se em todos os tratamentos com ultrassom menores valores de firmeza do tomate cereja ($p < 0,05$). Resultado diferente de Cao et al¹³, que observaram maiores níveis de firmeza durante o armazenamento em morangos tratados com ultrassom 40 kHz. Segundo Cao et al¹³, a manutenção da firmeza em morangos por tratamento com ultrassom foi relacionada com inativação de atividades de poligalacturonase e pectinametilsterase que estão associadas com morangos amolecidos. No presente estudo, os tratamentos com ultrassom promoveram 14 % de redução na firmeza do tomate cereja (controle). Este resultado corroborou Lu et al¹⁴, que trataram tomate cereja (tipo *grape*) com microondas com potência média por 50 segundos e verificaram redução de 13,8 % da firmeza, o que sugeriu amolecimento da textura do tomate. A textura fornece informação sobre a microestrutura de alimentos bem como da parede celular, lamela média e pressão de turgor¹⁵.

CONCLUSÃO

A aplicação do ultrassom combinado a agentes químicos pode auxiliar na redução de micro-organismos presentes em hortaliças, tornando esse equipamento potencial coadjuvante na etapa de sanitização. Além das análises microbiológicas, são necessárias análises físico-químicas e sensoriais para validar o uso deste equipamento na indústria de alimentos. Os tratamentos com ultrassom não alteraram os valores de TSS, pH e AT. Entretanto, verificou-se diferença significativa para os tratamentos com ultrassom nos índices de cor L e a e de firmeza. Textura e cor são atributos de qualidade crítica na aceitação pelos consumidores de frutas e hortaliças frescas.

Sendo o ultrassom uma potencial alternativa na sanitização, deve-se estudar outras variáveis do tratamento com ultrassom (tempo e frequência aplicada), para adequar as condições de processamento que potencializem a inativação de micro-organismos sem causar prejuízos à qualidade final do produto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS

1. Food and Agricultural Organization –FAO. Country information: Brazil: agriculture sector. 2009. [acessado 2012 maio 21]. Disponível em: [http://www.fao.org].
2. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. São Paulo: IBGE, 2003. [acessado 2012 jun 10]. Disponível em: [http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/].
3. Zhao Y, Tu K, Tu S, Liu M, Su J, Hou YP. A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi. *J Food Microbiol*. 2010;137(1):106-10.
4. Gusmão MTA, Gusmão SAL, Araújo JAC. Produtividade de tomate tipo cereja cultivado em ambiente protegido e em diferentes substratos. *Hort Bras*. 2006;24(2): 431-6.
5. Wang Y, Bao Y, Shen D, Feng W, Yu, T, Zhang J, et al. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *J Food Microbiol*. 2008; 123(3):234-9.
6. Lapidot A, Romling U, Yaron S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *J Food Microbiol*. 2006;109(2):229-33.
7. Alvaro JE, Moreno S, Dianez F, Santos M, Carrasco G, Urrestarazu M. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. *J Food Engg*. 2009;95(3):11-5.
8. Ruíz-Cruz S, Félix EA, Cinco MD, Osuna MAI, Aguilar GAG. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*. 2007; 18(11):1383-90.
9. São José JFB, Vanetti MCD. Effect of ultrasound and commercial sanitizers on natural microbiota and *Salmonella enterica Typhimurium* on cherry tomatoes. *Food Control*. 2012; 24(1-2): 95-9.
10. Gogate PR, Kabadi AM. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochem Eng J*. 2009; 44(1):60-72.
11. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.
12. AOAC. American Official of Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 18. ed. Washington, 2005.
13. Cao S, Hu Z, Pang B, Wang H, Xie H, Wu F. Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*. 2010;21(4):529-32.
14. Lu Y, Turley A, Dong X, Wu C. Reduction of *Salmonella enterica* on grape tomatoes using microwave heating. *Int J Food Microbiol*. 2011; 145(1): 349-52.
15. Fraeye I, Knockaert G, Van Buggenhout S, Duvetter T, Hendrickx M, Van Loey A. Enzyme infusion prior to thermal/high pressure processing of strawberries: mechanistic insight into firmness evolution. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2010;11(1):23-31.

Teor de carotenoides em nutricosméticos: análise da adequação e qualidade do produto

Carotenoids content in nutricosmetics products: evaluation of product adequacy and quality

RIALA6/1572

Fernanda Marques PEIXOTO¹, Renata Galhardo BORGUINI², Allien Monique Rosa MACHADO³, Ana Cristina Miranda Senna GÔUVEA¹, Sidney PACHECO², Ronoel Luiz de Oliveira GODOY^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Laboratório de Cromatografia Líquida, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Avenida das Américas 29501 - Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 23020-470. Tel.: (21) 3622-9600, Fax.: (21)3622-9713. E-mail: ronoel.godoy@embrapa.br

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil

³Curso de Bacharelado em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Nilópolis, RJ, Brasil

Recebido: 10.05.2013 - Aceito para publicação: 14.08.2013

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a adequação dos nutricosméticos contendo carotenoides em sua formulação em relação aos teores de β -caroteno, luteína, licopeno e zeaxantina, considerando-se as quantidades declaradas pelos fabricantes. Dezenove nutricosméticos foram adquiridos no comércio varejista do município do Rio de Janeiro, em 2012. Duas metodologias de extração foram aplicadas, variando-se de acordo com o tipo de invólucro (cápsula), veículos (excipientes) e carotenoides presentes. A quantificação e determinação do perfil de carotenoides nas amostras foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com método validado e acreditado. Quatro amostras das 19 analisadas estavam dentro dos limites estabelecidos pelas Boas Práticas de Fabricação (90 a 110 %). As demais amostras revelaram conteúdo inadequado de carotenoides e, conseqüentemente, falhas no controle de qualidade para a produção dos nutricosméticos. Desta forma, esta pesquisa demonstra que este setor deve ser objeto de atenção especial da vigilância sanitária, com necessidade de estabelecer legislação específica para regulamentar a fabricação, a rotulagem e a propaganda destes produtos.

Palavras-chave. carotenoides, beta caroteno, CLAE.

ABSTRACT

The present study analyzed the nutricosmetics adequacy referring to the carotenoids contents, such as β -carotene, lutein, lycopene and zeaxanthin, and these findings were compared with the contents declared by the manufacturers. Nineteen carotenoids-containing nutricosmetics were purchased at retail market in Rio de Janeiro city in 2012. Two methodologies of extraction were used according to the type of shell (capsules), carriers (excipients) and carotenoids. Quantification and determination of carotenoids profile were performed in a High Performed Liquid Chromatograph (HPLC) with validated and accredited methodology. Of 19 analyzed samples, four were within the limits established by the Good Manufacturing Practice specification (90 to 110 %), and the others were out of this range, revealing an inadequacy in the carotenoids contents and failures in the quality control of nutricosmetics production. This study demonstrated that the nutricosmetics production sector should receive a special attention from the health surveillance, and it needs a specific legislation to regulate the manufacture, labeling and advertising of these products.

Keywords. carotenoids, beta-carotene, HPLC.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos revelam que o ritmo de vida atual tem favorecido o aparecimento de doenças e alterações metabólicas e, como consequência, verifica-se uma forte tendência de mudança no comportamento do consumidor em relação à busca por um estilo de vida mais saudável. Esta busca por qualidade de vida, dentre outras medidas, passa pelo consumo de produtos alimentícios e não-alimentícios que promovam bem estar e saúde. Dentre os não alimentícios, estão formulações que contêm um amplo espectro de substâncias bioativas, tais como probióticos e prebióticos, vitaminas, minerais, além de metabólitos secundários de plantas, como os compostos fenólicos, carotenoides, glucosinolatos, e alcaloides, as quais são veiculadas isoladas ou/e incorporadas a extratos alimentares¹. Tais produtos são comercializados sob a forma de cápsulas, soluções, géis, licores, pós e granulados, aos quais são atribuídos benefícios diretos ou indiretos à saúde. Não podem ser classificados como alimento e, portanto, são designados como um híbrido entre nutrientes e produtos farmacêuticos – os nutracêuticos².

Segundo Zeisel³, os nutracêuticos são suplementos alimentares que proporcionam uma forma concentrada de um componente bioativo do alimento em uma matriz não alimentícia. Eles são utilizados com a finalidade de promoção da saúde em doses superiores às obtidas a partir da alimentação diária. Na Europa não existe uma regulação específica para o controle dos nutracêuticos, embora estejam sob as mesmas leis que regulam os medicamentos⁴. Nos EUA, a *Food and Drug Administration* (FDA) regula os suplementos alimentares sob diretrizes diferentes daquelas que regulamentam os alimentos e medicamentos². No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os classifica como alimentos funcionais, com propriedade funcional e reivindicações de saúde. Uma vez classificados como alimentos funcionais, eles ficam sujeitos a regras específicas de rotulagem, para alegação de qualquer benefício à saúde, e inseridos na categoria de alimentos e embalagens com registro obrigatório^{5,6}. Embora seja um termo reconhecido internacionalmente, ainda não existe um consenso sobre seu significado.

De outro modo, os alimentos funcionais são aqueles que, quando consumidos regularmente, produzem um determinado efeito benéfico à saúde, efeito este superior ao fornecido por suas propriedades nutricionais⁷. A fronteira entre os nutracêuticos e alimentos funcionais não é sempre clara, sendo a principal diferença a forma na qual são

veiculados. Os nutracêuticos podem ser consumidos na forma de cápsulas, pastilhas, comprimidos, dentre outras, enquanto os alimentos funcionais são sempre consumidos como alimentos convencionais. Assim, quando um composto bioativo é introduzido em um determinado alimento, ele passa a ser considerado um alimento funcional. Se o mesmo composto for revestido por uma cápsula, será chamado de nutracêutico².

Recentemente, com o advento da medicina “*anti-aging*”, que objetiva retardar o envelhecimento das células, para preservar suas funções vitais e atender aos padrões estéticos, tem surgido no mercado um novo termo; um termo mercadológico que vem sendo aplicado como sinônimo de nutracêutico. Trata-se do termo “nutricosmético” que, embora esteja associado à geração de efeitos biológicos benéficos, é direcionado aos alvos clínicos da Indústria Cosmética, tais como pele, unhas e cabelo.

Neste contexto, os nutricosméticos poderiam ser classificados como uma subcategoria dos nutracêuticos, pois suas formulações típicas também incluem um grande espectro de compostos bioativos; no entanto, sua alegação de uso vai além da saúde e envolve indicações como: reparação, prevenção, proteção solar, firmeza, pigmentação e branqueamento da pele; retenção, crescimento, restauração, nutrição e aumento de volume dos cabelos e o fortalecimento das unhas.

Alguns nutricosméticos contêm em sua formulação muitos dos carotenoides conhecidos, tais como: α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina. O β -caroteno, uma provitamina A, acumula-se na pele, proporcionando uma cor amarelo-dourada, e atua na fotoproteção contra os danos no DNA, induzidos pelos raios UV, e no combate à supressão imunitária⁸. A lesão cutânea é observada pelo aparecimento de manchas e foto envelhecimento, o que acelera a formação de rugas e linhas de expressão, câncer de pele e desidratação. A luteína e zeaxantina acumulam-se preferencialmente na mácula lútea, protegendo a retina contra os danos foto oxidativos da luz UV.

Os nutricosméticos estão cada vez mais populares entre os consumidores, representando uma poderosa ferramenta para fins mercadológicos e, por isto, existe um grande número de produtos disponíveis no mercado⁹. O crescimento exponencial deste setor faz surgir a preocupação com relação a fraudes e desvios de qualidade, e com o surgimento de casos de intoxicação, bem como em evitar falsas expectativas no consumidor. Os nutricosméticos não são medicamentos, no entanto a percepção dos consumidores é dúbia. Ora, não são

encarados como medicamentos e por isso gerariam menos efeitos colaterais, ora são levados a crer que a qualidade e a produção são compatíveis com as normas seguidas pela Indústria Farmacêutica¹⁰. Vale salientar que, embora se trate de compostos naturalmente presentes nos alimentos, a sua utilização em doses superiores às normalmente encontradas nestes podem causar efeitos adversos desconhecidos.

A composição e o conteúdo dos carotenoides nos alimentos (como em qualquer outra fonte natural) variam dependendo da estação do ano, do clima, da temperatura, da umidade do solo, e de outros fatores. Os carotenoides são altamente insaturados e propensos à isomerização e oxidação. A isomerização, destes compostos da forma *trans* (configuração habitual na natureza) para o isômero *cis*, é facilitada pelo contato com ácidos, tratamento térmico e exposição à luz¹¹. Por isso, a coleta, identificação, manutenção da uniformidade, quantificação e padronização são fatores críticos a serem considerados⁷ durante as etapas de fabricação dos produtos isolados ou concentrados. Ademais, a utilização de técnicas analíticas avançadas e robustas, além de metodologia analítica validada, é outro aspecto indispensável na pesquisa e no controle de qualidade dos nutricosméticos.

Num contexto de indefinição técnica, pouca ou nenhuma normatização e fiscalização, além do mercado emergente, surgiu a presente pesquisa, cujo objetivo foi verificar a adequação dos nutricosméticos contendo carotenoides em relação ao teor de β -caroteno, luteína, licopeno e zeaxantina, considerando-se as quantidades declaradas pelo fabricante.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises dos produtos foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, que é acreditado pelo Instituto Nacional de Qualidade, Metrologia, Normatização e Industrial (INMETRO), segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, para análise de carotenoides.

Dezenove (19) produtos denominados nutricosméticos contendo carotenoides em sua formulação foram adquiridos no comércio varejista do município do Rio de Janeiro, em 2012. Cada amostra foi codificada como NC01, NC02 (...) NC19 e analisada dentro do prazo de validade. As amostras foram armazenadas em suas embalagens originais fechadas, em local fresco (15 a 30 °C), seco e ao abrigo da luz. Os solventes utilizados foram de grau de cromatográfico e adquiridos da Tedia® Brazil, incluindo

acetona, éter de petróleo, metanol (MeOH), *tert*-butil metil éter (TMBE). Os reagentes para a extração de carotenoides foram adquiridos da Tedia® Brazil (Celite 545), Merck® Brasil (Hidróxido de magnésio PA), Quimex® (Sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio) e gás nitrogênio 4,6 da White Martins®. A água ultrapura (18,2 M Ω .cm) foi produzida por sistema Milli-Q® (Millipore, Brasil). Os padrões analíticos de carotenoides foram isolados no próprio laboratório, a partir de fontes naturais, com pureza superior a 97 %.

Extração

Foram utilizados dois métodos de extração, variando de acordo com o tipo de invólucro (cápsula), veículos (excipientes) e carotenoides presentes nas amostras. Utilizou-se o método descrito por Rodriguez-Amaya¹¹ para a extração das cápsulas duras. Para as cápsulas moles, todo o conteúdo da cápsula foi dissolvido diretamente em éter etílico e/ou éter de petróleo, de acordo com os carotenoides declarados. A escolha do solvente orgânico foi feita obedecendo-se a polaridade dos compostos, se carotenos (éter de petróleo) ou xantofilas (éter etílico). Todo o procedimento de extração e análise foi realizado ao abrigo da luz e à temperatura controlada (22 °C), para minimizar oxidação e isomerização dos carotenoides.

Análise por CLAE

A quantificação e determinação do perfil de carotenoides nas amostras foram realizadas por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com forno para colunas (33 °C), detector de rede de diodos UV-Vis (DAD 996 - Waters®), com coluna C₃₀ S-3 YCM® Carotenoid de 4,6 x 250 mm. A separação foi obtida por um gradiente de eluição, com fase móvel binária de metanol/éter metil *tert*-butílico, utilizando fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 15 μ L e tempo de corrida de 28 minutos. Os carotenoides foram identificados com base em seus tempos de retenção e de espectros de absorção UV-Vis, em comparação com os tempos de retenção dos padrões dos carotenoides. A quantificação de carotenoides totais foi realizada por espectrofotometria de UV-VIS a 450 nm.

Análise dos resultados

Como não há legislação específica para estes produtos e visando estabelecer um critério comparativo, considerou-se satisfatória a variação dos teores entre 90 e 110 % em relação ao valor declarado pelo fabricante, conforme o controle de qualidade da Indústria Farmacêutica¹².

Tabela 1. Descrição do produto, alegação de benefícios e recomendação de consumo, de acordo com informação de rotulagem dos nutricosméticos adquiridos no mercado varejista do Rio de Janeiro em 2012

Produto	Descrição	Alegação	Recomendação de consumo
NC01	Luteína de Flor de <i>Tagetes Erecta</i> com vitaminas e minerais	Ação contra radicais livres e antienvhecimento	1 cápsula ao dia
NC02	Licopeno do tomate, <i>Lactobacillus johnsonii</i> e enriquecido com vitamina A	Prevenção de herpes labial, queimadura solar, manchas pigmentadas, xerose e intensificação do bronzeado	1 cápsula ao dia, ingerir preferencialmente durante uma refeição
NC03	Ésteres de luteína de Flor de <i>Tagetes Erecta</i>	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia com as refeições
NC04	Luteína FloraGlo 20 %	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia
NC05	Licopeno do tomate	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia com as refeições
NC06	Licopeno do tomate enriquecido com betacaroteno e vitamina E	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia
NC07	Licopeno do tomate	Ação antioxidante e agem na formação da melanina	1 cápsula ao dia
NC08	Suplemento de Vitamina A à base de beta caroteno	Ação como pró-vitamina A	1 cápsula ao dia
NC09	Beta caroteno 6000UI	Suplementação vitamínica	1 cápsula ao dia na principal refeição
NC10	Suplemento de Vitamina A à base de beta caroteno	Ação antioxidante, formação de melanina, pigmentação e proteção da pele	1 cápsula ao dia
NC11	Suplemento de Vitamina A e minerais	Regeneração das células do cabelo, formação de queratina e redução da queda do folículo	1 cápsula ao dia, após uma refeição ou conforme orientação de nutricionista ou médico
NC12	Beta caroteno 15 mg	Suplementação vitamínica	Não há recomendação
NC13	Óleo de linhaça adicionado de licopeno de tomate, luteína da flor de <i>Tagetes Erecta</i> , vitaminas e minerais	N.I.	1 cápsula ao dia
NC14	Licopeno com óleo de borragem enriquecido com vitamina A, E e selênio	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia, após uma refeição ou conforme orientação de nutricionista ou médico
NC15	Luteína e zeaxantina da flor de <i>Tagetes Erecta</i> com óleo de borragem enriquecido com vitaminas C e E	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia, após uma refeição ou conforme orientação de nutricionista ou médico
NC16	Licopeno, luteína e zeaxantina da flor de <i>Tagetes Erecta</i> com ômega 3 de óleo de peixe enriquecidos com vitaminas e minerais	Ação antioxidante que protegem as células contra radicais livres	1 cápsula ao dia, após uma refeição ou conforme orientação de nutricionista ou médico
NC17	Óleo de semente de groselha negra, Omega 3 de óleo de peixe, licopeno de tomate enriquecido com vitaminas C e E	Atua sobre as principais causas da queda e melhora a qualidade do cabelo. Fortalece as unhas quebradiças	2 cápsulas por dia durante as refeições
NC18	Licopeno de tomate, extrato de soja enriquecido com vitamina C	Previne e corrige a perda de firmeza da pele e as rugas no rosto	2 cápsulas por dia durante uma das refeições
NC19	Licopeno de tomate, zinco, vitamina E e oligonutrientes essenciais	Aumento das defesas da derme, fotoproteção oral, prepara a pele para a exposição solar	2 cápsulas ao dia, preferencialmente pela manhã, ou conforme orientação de médico e/ou nutricionista.

N.I. = não informado

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações obtidas nas embalagens dos produtos, relativas à descrição do produto, alegação de benefícios e recomendação de consumo encontram-se na Tabela 1.

Quanto à recomendação de consumo, vale destacar que os carotenoides são compostos lipossolúveis e que a quantidade de gordura da dieta aumenta sua biodisponibilidade¹³, uma vez que necessitam de uma fonte lipídica para serem veiculados e, posteriormente, absorvidos pelo organismo. Desse modo, destaca-se que apenas

Tabela 2. Carotenoides presentes nos nutricosméticos, teor declarado pelo fabricante (em mg), teor encontrado após análise por CLAE (em mg), desvio entre teor declarado e encontrado (em %), adequação do produto em relação às BPF e preço por cápsula

Produto	Carotenoides no produto	Teor declarado (mg)	Teor encontrado (mg)	Desvio (%)**	Adequação do produto	Preço por caps (R\$)
NC01	Luteína	10	2,59	-74,1	Não	2,91
	β-caroteno*	3,64	12,06	+235		
NC02	Licopeno	N.D.	4,35	N.C.	Não	3,63
	β-caroteno	N.D.	0,12	N.C.		
NC03	Luteína	20	12,42	-37,9	Não	1,12
NC04	Luteína	10	9,1	-9	Sim	1,83
NC05	Licopeno	10	12,42	+24,2	Não	1,22
NC06	Licopeno	5,1	1,57	-69,22	Não	1,43
	β-caroteno	3,6	3,83	+6,39		
NC07	Licopeno	5	4,82	-3,6	Sim	1,36
NC08	β-caroteno	4	2,68	-33	Não	0,85
NC09	β-caroteno	3,64	3,17	-12,91	Sim	0,54
NC10	β-caroteno	3,64	3,45	-5,22	Sim	1,61
NC11	β-caroteno	3,64	4,76	+30,77	Não	3,81
NC12	β-caroteno	15	15,97	+6,47	Sim	0,47
NC13	Licopeno	5,1	1,25	-75,49	Não	3,00
	Luteína	4	2,8	-30		
	β-caroteno*	3,64	5,01	+39,17		
NC14	Licopeno	6	6,22	+3,67	Não	3,55
	β-caroteno*	3,64	4,92	+36,67		
NC15	Luteína;	10	18,22	+82,2	Não	3,81
	Zeaxantina	0,5	1,34	+168		
NC16	Licopeno	6	2,92	-51,33	Não	3,81
	Luteína	10	13,77	+37,7		
	Zeaxantina	0,5	1,08	+116		
NC17	Licopeno	N.D.	1,52	N.C.	Não	2,00
NC18	Licopeno	N.D.	2,1	N.C.	Não	2,07
NC19	Licopeno	10	0,016	-99,84	Não	1,65

N.D.: não declarado

N.C.: não calculado

*Os valores declarados como 600 µg de vitamina A (equivalente a 100 % da Ingestão Diária Recomendada) foram convertidos para 3,64 mg de β-caroteno

**Percentual de carotenoides encontrado em relação ao conteúdo declarado pelo fabricante

58 % dos fabricantes orientam corretamente o consumidor quanto ao consumo do produto durante as refeições (Tabela 1) para viabilizar a absorção dos carotenoides.

Os dados relativos aos tipos de carotenoides presentes nos nutricosméticos, ao teor declarado pelo fabricante, ao teor encontrado após análise por CLAE, ao desvio entre teor declarado e encontrado e à avaliação da adequação em relação às BPF foram apresentados na Tabela 2. Além disso, apresenta-se o preço por cápsula de cada produto, variando de R\$ 0,47 a 3,81, que foi calculado a partir do atual valor de mercado e da quantidade de cápsulas presentes em cada embalagem.

Ao se comparar os resultados obtidos nas análises com os valores declarados (quando informado), observou-

se que quatro das dezenove amostras se encontravam dentro do limite estabelecido como adequado (90 a 110 %). Vale salientar que três amostras (NC02, NC17 e NC18) não apresentavam declaração de concentração de carotenoides no rótulo, embora seja uma exigência da ANVISA, e que, portanto, a análise comparativa não foi possível, embora os carotenoides tenham sido quantificados.

Em duas amostras (NC06 e NC14) pelo menos um dos carotenoides declarados apresentava-se dentro dos limites estabelecidos, enquanto que os demais estavam fora deste limite. No entanto, como resultado de um dos carotenoides estava fora, desqualificou-se a amostra de uma forma geral. Vale destacar também dois resultados bastante extremos, onde as amostras apresentaram teores

superiores a 168 e 235 % do conteúdo declarado (NC01 e NC15, respectivamente). Aman et al¹⁴ verificaram que das onze amostras testadas de suplementos contendo carotenoides, todas apresentaram dosagens até 45 % superiores às declaradas. Isto sugere que alguns fabricantes, por conhecerem a baixa estabilidade destes compostos, praticam a superdosagem a fim de compensar possíveis perdas durante o armazenamento. Além disso, uma amostra avaliada apresentou resultado 99,8 % inferior ao declarado, demonstrando pouco ou nenhum controle do processo de produção. Vale salientar que certos produtos, que declaram apresentar carotenoides, tais como a luteína e a zeaxantina, não foram capazes de demonstrar compatibilidade com sua rotulagem, por razões já conhecidas entre os pesquisadores da área¹⁵, tal como a dificuldade da seleção de boas fontes naturais (alimentos e/ou plantas) para o isolamento destes compostos. Assim, para exemplificar a dificuldade mencionada, um dos fabricantes declarou que o produto (NC01) continha altos teores de luteína e menores de β -caroteno, no entanto, ao se analisar o produto, constatou-se a ocorrência da inversão nas concentrações, já que foram encontrados alto valor do β -caroteno (235 % acima do declarado) e baixo valor da luteína (74 % inferior ao declarado). Este fato pode ser explicado pela maior disponibilidade de fontes naturais para a obtenção de β -caroteno, em detrimento da luteína. A maior abundância deste composto também pode ser confirmada pela presença do mesmo em amostras em que o β -caroteno não havia sido declarado, tal como a amostra NC16.

Ademais, não foi observada relação entre os preços praticados pelos fabricantes e a qualidade dos produtos. O produto NC12, embora apresentasse maior nível de equivalência de teor, tinha o menor custo por cápsula. Enquanto o NC19, que obteve o pior resultado comparativo, apresentou um elevado custo por cápsula, demonstrando não haver relação direta entre o preço e a qualidade dos produtos.

Os nutracêuticos têm sido considerados como um fenômeno de mercado e suas vendas crescem expressivamente. Os resultados encontrados indicaram que o número de produtos inadequados, que exibiram alto desvio em relação ao teor de carotenoides declarado no rótulo, é relevante (aproximadamente 80 %) e que o setor deve ser objeto de atenção especial da vigilância sanitária, havendo a necessidade de legislação específica para regulamentação da fabricação, da rotulagem e da propaganda desses produtos. Além disso, os profissionais da área de saúde, que fazem a prescrição destes produtos,

devem ser alertados quanto aos riscos da falta de controle pelos fabricantes que, além de declararem o seu conteúdo erroneamente, demonstraram não conformidade quanto às Boas Práticas de Fabricação (BPF). Cabe concluir que a falta de controle de qualidade na fabricação destes produtos, que são consumidos na expectativa de apresentarem efeitos benéficos à saúde e à estética, impacta diretamente em sua eficácia e segurança, podendo representar um potencial risco ao consumidor.

REFERÊNCIAS

1. Lockwood GB. The quality of commercially available nutraceutical supplements and food sources. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(1):3-10.
2. Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochem*. 2007; 68(22-24): 2986-3008.
3. Zeisel SH. Regulation of "Nutraceuticals". *Science*. 1999; 285(5435):1853-5.
4. Coppens P, Silva MF, Silva PS. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicol*. 2006; 221(1):59-74.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RES nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 03 mai. 1999. Seção 1, nº398. p.11.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RES nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 03 mai. 1999. Seção 1, nº399. p.12.
7. Bernal J, Mendiola JA, Ibañez E, Cifuentes, A. Advanced analysis of nutraceuticals. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;55(4): 758-74.
8. Anunciato TP, Filho PAR. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *J Cosmet Dermatol*. 2010;11(1):51-4.
9. Bagchi D. Nutraceutical and functional food regulations in the United States around the world. *Toxicol*. 2006;221(1): 1-3.
10. Rossi D, Guerrini A, Bruni R, Brognara E, Borgatti M, Gambari R, et al. Trans-Resveratrol in nutraceuticals: Issues in retail quality and effectiveness. *Molecules*. 2012;17(10):12393-405.
11. Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoids analysis in foods. Washington (DC): International Life Sciences Institute (ILSI) Press; 1999.
12. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1996.
13. Yonekura L, Nagao A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(1):107-15.
14. Aman R, Bayha S, Carle R, Schieber A. Determination of carotenoid stereoisomers in commercial dietary supplements by High performance Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem*. 2004;52(20):6086-90.
15. Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem*. 2002;78(3): 389-98.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional. A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores. Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas Nº 12, Nº 13 e Nº 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 ARTIGOS ORIGINAIS: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06¹, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Henington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

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

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

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

Capítulos de livro:

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

Dissertações, teses e monografias:

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

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

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

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

Dados eletrônicos:

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

Legislação:

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

Autoria institucional:

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

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

Patente:

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