

ISSN 0073-9855



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

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

Volume 68 número 1, 2009  
Janeiro-Abril 2009

Publicação quadrimestral/Quadri-annual publication  
Solicita-se permuta/Exchange desired



## SUMÁRIO/CONTENTS

### ■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLES

- 1183 A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais**  
Lipid oxidation of chicken meat and the impact of the addition of sage (*Salvia officinalis*, L.) and garlic (*Allium sativum*, L.) as natural antioxidants  
LILIAN REGINA BARROS MARIUTTI, NEURA BRAGAGNOLO ..... 1-11

### ■ ARTIGOS ORIGINAIS/ ORIGINAL ARTICLES

- 1184 Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil**  
Comparison of analytical methods in the determination of lipids and polyunsaturated fatty acids by gas chromatography in infant formula  
MAHYARA MARKIEVICZ MANCIO KUS, SABRIA AUED-PIMENTEL, JORGE MANCINI-FILHO ..... 12-20
- 1185 Valor nutritivo de peixes da costa marítima de Alagoas, Brasil**  
Nutritive values of fishes from maritime coast of Alagoas, Brazil  
MARIA EMÍLIA DA SILVA MENEZES, GISELDA MACEMA LIRA, CRISTHIANE MARIA BAZÍLIO DE OMENA, JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS, ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA ..... 21-28
- 1186 Influência do tipo de filtro no teor de cafeína de bebidas de café**  
Effect of filter type on the caffeine contents in the coffee beverages  
SILVANA MARIANA SREBERNICH, EDUARDO VICENTE, SANDRA FRANCESCHINI, ANA LAURA MINATEL ..... 29-33
- 1187 Caracterização microbiológica, físico-química e sensorial de hambúrgueres de carne de avestruz (*Struthio camellus*), elaborados com substituto de gordura**  
Microbiological, physical chemical and sensory characterization of the ostrich (*Struthio camellus*) meat burgers manufactured with fat substitute  
ÉRICA MENEZES SALVINO, JOÃO ANDRADE DA SILVA, ELCIANE DA SILVA NOBREGA, JOSÉ CARLOS DO NASCIMENTO, MARIA JOSÉ DE CARVALHO COSTA, JANEYRE FERREIRA MACIEL ..... 34-41
- 1188 Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis***  
Total phenolic compounds, antioxidant and antifungal activities of multimixtures enriched by adding microalgae *Spirulina platensis*  
VÂNIA DA SILVA BIERHALS, VANESSA GOULART MACHADO, WALESKA OLIVEIRA ECHEVENGUÁ, JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA, ELIANA BADIALE FURLONG ..... 42-48

<b>1189</b>	<b>Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento <i>in vitro</i> de bactérias veiculadas por alimentos</b> Effect of different preservatives concentrations on the <i>in vitro</i> growth of bacteria carried by food ANA MARIA QUEIJEIRO LÓPEZ, SHEYLA FERREIRA LIMA-COELHO, GISELDA MACENA LIRA.....	49-57
<b>1190</b>	<b>Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (<i>Citrus limon</i>) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação</b> Antioxidant activity of lemon ( <i>Citrus limon</i> ) seeds extract with addition of soybean oil under thermoxidation process DÉBORA MARIA MORENO LUZIA, NEUZA JORGE.....	58-63
<b>1191</b>	<b>Qualidade e autenticidade de amostras de chá de camomila (<i>Matricaria recutita</i> L. – Asteraceae)</b> Quality and authenticity of chamomile ( <i>Matricaria recutita</i> L. – Asteraceae) tea samples GISLAINE JANAÍNA SANCHEZ FALKOWSKI, EZILDA JACOMASSI, ORLANDO SEIKO TAKEMURA.....	64-72
<b>1192</b>	<b>Condições higiênico-sanitárias de restaurantes comerciais tipo self-service pela avaliação da qualidade microbiológica de alimentos de preparações mistas</b> Hygiene conditions of the self-service restaurants by evaluating the microbial quality of the mixed-food preparations TÂNIA MARIA DE SOUZA GENTA, JANE MARTHA GRATON MIKCHA, GRACIETTE MATIOLI .....	73-82
<b>1193</b>	<b>Condições higiênico-sanitárias de agrião, alface e repolho minimamente processados e alface <i>in natura</i></b> Hygienic conditions of minimally-processed watercress, lettuce and cabbage, and fresh-cut lettuce EVELYN RAPANELLO, TERUMI OYAMA FUZIHARA, SILENE MARIA NUNES, VILMA DOS SANTOS MENEZES GAIOTTO DAROS, LÚCIA VANNUCCI SAVIGNANO .....	83-90
<b>1194</b>	<b>Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate</b> Fungi contamination in the chamomile, anis and mate teas. SUZANA CARVALHO, RODRIGO MAKOWIECKY STUART, IDA CHAPAVAL PIMENTEL, PATRICIA DO ROCIO DALZOTO, JUAREZ GABARDO, MARIA APARECIDA CASSILHA ZAWADNEAK .....	91-95
<b>1195</b>	<b>Condições higiênico-sanitárias da pimenta do reino em pó (<i>Piper nigrum</i> L.) com o emprego de duas diferentes técnicas para detecção de sujidades leves</b> Assessment of hygienic conditions of ground pepper ( <i>Piper nigrum</i> L.) by means of two methodologies for detecting the light filth MÁRCIA BITTAR ATUI, MÁRCIA JORGE CASTEJON, ROSEMEIRE YAMASHIRO, TATIANA DE LUCCA, PAUL W. FLINN.....	96-101
<b>1196</b>	<b>Ação antimicrobiana <i>in vitro</i> de extratos glicólicos de <i>Psidium guajava</i> L., <i>Syzygium cumini</i> L. e <i>Pimpinella anisum</i> L</b> <i>In vitro</i> antimicrobial action of extracts glicolics of <i>Psidium guajava</i> L., <i>Syzygium cumini</i> L. and <i>Pimpinella anisum</i> L CRISTIANE APARECIDA PEREIRA, POLYANA DAS GRAÇAS FIGUEIREDO VILELA, LUCIANE DIAS DE OLIVEIRIA, ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE .....	102-108
<b>1197</b>	<b>Estrutura da comunidade fitoplancônica com ênfase em Cyanobacteria no reservatório de Tapacurá-PE</b> Structure of the phytoplankton community with emphasis on Cyanobacteria in Tapacurá reservoir- PE CAROLINA MENDES DE ANDRADE, CÍCERO TIAGO DA SILVA GOMES, NÍSIA KARINE CAVALCANTI VASCONCELOS ARAGÃO, EDVANI MARIA SILVA, GIULLIARI ALAN DA SILVA TAVARES DE LIRA .....	109-117
<b>1198</b>	<b>Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas de pacientes hospitalizados</b> Citral antifungal activity against <i>Candida</i> genus yeasts isolated from hospitalized patients TATIANE MORAIS FERREIRA, FERNANDO DE SÁ SILVA, GUILHERME RODRIGUES TEODORO, ANA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA, AGUIDA MARIA, MILTON BELTRAME JÚNIOR, SÔNIA KHOURI.....	118-125

- 
- 1199 Frequência de diagnóstico de lesões do colo uterino por faixa etária em mulheres atendidas no Programa de rastreamento Viva Mulher no período de 2004 a 2008**  
 Review on the occurrence of uterine cervix lesions according to age group among women enrolled in the Viva Mulher – Prevention Program during the period from 2004 to 2008  
 LUZIA SETUKO UMEDA YAMAMOTO, SONIA MARIA MIRANDA PEREIRA, DANIELA ETLINGER, LUCIANA SILVA AGUIAR, YURIKO ITO SAKAI, NEUZA KASUMI SHIRATA, MARIETE DOS SANTOS TEIXEIRA, CELSO DI LORETO..... 126-132
- 1200 Estudo retrospectivo dos diagnósticos cito-histopatológicos nas atipias de significado indeterminado**  
 Retrospective study on cyto-histological diagnoses in the atypical squamous cells of undetermined significance  
 NEUZA KASUMI SHIRATA, CARLA DUCATTI, LUZIA SETUKO UMEDA YAMAMOTO, SONIA MARIA MIRANDA PEREIRA, DANIELA ETLINGER, LUCIANA SILVA AGUIAR, YURIKO ITO SAKAI, CELSO DI LORETO..... 133-139
- 1201 Medula cervical como material para diagnóstico laboratorial da Raiva**  
 Cervical medulla as laboratory diagnosis material for Rabies  
 BENEDITO NEILSON ROLIM, MARIA FÁTIMA DA SILVA TEIXEIRA, EDMARA CHAVES COSTA, NELIO BATISTA DE MORAIS, KATARINY MICHELLI DE ARAÚJO PINHEIRO, TANIA VALESKA MEDEIROS DANTAS, SUZANA APARECIDA COSTA DE ARAUJO, VALESKA SHELDA PESSOA DE MELO, ARYANA LUSHESE VASCONCELOS DE LIMA FEITOSA, PHYLLIS CATHARINA ROMIJN..... 139-144
- 1202 Cultivo do vírus da rubéola em SIRC (linhagem celular de cornea de coelho) em vários meios de cultura**  
 Growth of rubella virus into SIRC (rabbit cornea cell line) using various culture media  
 CRISTINA ADELAIDE FIGUEIREDO, MARIA ISABEL DE OLIVEIRA, ANA MARIA SARDINHA AFONSO, SUELY PIRES CURTI..... 145-149
- **COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION**
- 1203 Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas**  
 Microbiological quality of minimally processed fruits and vegetables  
 TALINE FERNANDA SMANIOTO, NATÁLIA JORDÃO PIROLO, ELIANE MARIA RAVASI STÉFANO SIMIONATO, MARIA CECÍLIA DE ARRUDA..... 150-154
- 1204 Comparação entre os métodos de Lane-Eynon e polarimétrico para determinação de amido em farinha de mandioca**  
 The Lane-Eynon technique and the polarimetric assay performance for determining starch in manioc  
 FABIOLA LOPES CAETANO MACHADO, GISÉLIA CAMPOS, MARIANA TEMPONI GODINHO SOUZA ..... 155-159
- **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES**
- Instabilidade oxidativa do óleo de soja submetido à fritura de alimentos congelados**  
 Oxidative instability of soybean oil submitted to the frying of frozen foods  
 TANAMATI, AAC. .... 160
- Estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão (*Citrus limon*)**  
 Oxidative stability of the soybean oil added to lemon seeds extract (*Citrus limon*)  
 LUZIA, DMM ..... 161



## A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais

Lipid oxidation of chicken meat and the impact of the addition of sage (*Salvia officinalis*, L.) and garlic (*Allium sativum*, L.) as natural antioxidants

RIALA6/1183

Lilian Regina Barros MARIUTTI<sup>1</sup>, Neura BRAGAGNOLO<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.  
Tel.: +55 19 35212160, Fax: +55 19 3521-2153, e-mail: neura@fea.unicamp.br  
Recebido: 19.01.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

A manutenção da qualidade de um alimento por um período prolongado requer o uso de antioxidantes. Porém, devido a crescente preocupação em adquirir hábitos alimentares saudáveis e ao interesse em consumir produtos alimentícios sem aditivos sintéticos, torna-se necessária a pesquisa de fontes de antioxidantes naturais, como a sálvia e o alho, para minimizar a oxidação lipídica. A carne de frango é um alimento altamente susceptível à oxidação lipídica em função do elevado teor de ácidos graxos insaturados na sua composição. A formação de óxidos de colesterol e a degradação de ácidos graxos, principalmente dos poli-insaturados, somada a formação de compostos voláteis secundários oriundos da oxidação lipídica, possuem um papel de destaque entre os fatores responsáveis pela perda de qualidade e das características nutricionais causadas tanto pelo processamento térmico ou sob alta pressão quanto pelas alterações decorrentes do armazenamento da carne de frango. Além disso, o consumo de lipídios, principalmente de lipídios oxidados, tem sido alvo de constante investigação pela área da saúde em vista da alta correlação entre a ingestão destes compostos e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de outras doenças crônicas não transmissíveis.

**Palavras-chave.** ácidos graxos, alta pressão, doenças cardiovasculares, óxidos de colesterol, qualidade nutricional.

### ABSTRACT

Preserving food quality for long periods requires the use of antioxidants and nowadays, the trend toward consuming foodstuff free from synthetic additives led to the research of natural sources of food preservatives, such as sage and garlic. Chicken meat has a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) being quite prone to lipid oxidation. The cholesterol oxidation, the changes in fatty acid profile, specially the degradation PUFA, and the formation volatile aldehydes derived from lipid oxidation could be considered as the main factors responsible for the quality and nutritional losses during processing and storage in chicken meat. In addition, dietary intake of oxidised lipids has been constantly investigated by the medical area due to the high correlations between the consumption of these lipids and the development of cardiovascular and other degenerative diseases.

**Key words.** fatty acids, high pressure, cardiovascular diseases, cholesterol oxides, nutritional quality.

## INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem se destacado nos últimos anos pelo aumento da exportação de produtos com maior valor agregado, ou seja, produtos embalados e prontos para o consumo, um conceito de alimentos saudáveis com rápido preparo e cada vez mais procurado no exterior. A carne de frango é um alimento altamente suscetível a oxidação lipídica em função do elevado teor de ácidos graxos insaturados na sua composição. A formação de óxidos de colesterol, as alterações na composição de ácidos graxos e a consequente formação de compostos voláteis provenientes da oxidação lipídica possuem um papel de destaque dentre os fatores responsáveis pela perda de qualidade e das características nutricionais durante o processamento e o armazenamento da carne de frango. A adição de condimentos a carne de frango, além de conferir as características organolépticas desejadas, também pode auxiliar na sua preservação, prevenindo ou retardando sua deterioração durante o processamento ou armazenamento.

Os produtos de oxidação do colesterol formam um grupo com mais de 80 compostos conhecidos que são formados a partir do colesterol durante o processamento e armazenamento dos alimentos, podendo também ser formados enzimaticamente<sup>1,2</sup>. A formação dos óxidos de colesterol é influenciada pela presença de ácidos graxos insaturados, teor de colesterol, atividade de água, presença de oxigênio, de radicais livres e de íons metálicos, além da exposição à luz, ao calor e à irradiação, dentre outros fatores<sup>1,3</sup>.

O colesterol é um composto presente em todos os alimentos de origem animal e, entre esses, aqueles que contêm teores significativos deste lipídio são fontes potenciais de óxidos de colesterol na dieta. Embora os níveis seguros de ingestão de óxidos de colesterol ainda não estejam estabelecidos, estes compostos podem ser absorvidos a partir da dieta numa proporção de 6 a 90%<sup>4</sup> e a exposição crônica pode constituir um risco à saúde humana, devido aos efeitos potencialmente aterogênicos<sup>6-9</sup>, citotóxicos<sup>10-14</sup>, mutagênicos e possivelmente carcinogênicos<sup>10,15-17</sup>. Estudos epidemiológicos também indicam a existência de correlação entre a presença de óxidos de colesterol nos tecidos e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como a doença de Alzheimer<sup>18,19</sup> e a catarata<sup>20</sup>. Alguns óxidos de colesterol, como o 7-cetocolesterol, o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, o 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, o 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol e o 5,6 $\beta$ -

epoxicolesterol, atualmente estão sendo usados como indicadores biológicos de danos oxidativos em pacientes com *diabetes mellitus*<sup>21,22</sup>.

Os óxidos de colesterol mais comumente encontrados nos alimentos são os derivados do anel B da cadeia principal do colesterol, como o 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, o 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, o 7-cetocolesterol, o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e o 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol e, em menores concentrações, os derivados da cadeia lateral, como o 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol e o 25-hidroxicolesterol<sup>23</sup>.

Os ácidos graxos possuem uma grande variedade de funções metabólicas importantes para todas as formas de vida, e constituem uma fonte rica de energia e de carbono, sendo, portanto, uma forma conveniente de armazenamento de energia. Entretanto, a importância dos ácidos graxos na nutrição humana vai além de seu papel como fonte de calorias, sua estrutura e hidrofobicidade são cruciais para a modulação da estrutura da membrana celular, além de serem precursores da ativação de moléculas sinalizadoras<sup>24</sup>. Além disso, os ácidos graxos provenientes da dieta têm sido correlacionados com diversas alterações metabólicas e fisiológicas ligadas ao desenvolvimento ou prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, *diabetes mellitus*, entre outras<sup>25-28</sup>.

Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e os poli-insaturados (PUFA) estimulam a redução dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol; no entanto, os ácidos graxos saturados (SFA) com menos de 18 carbonos na cadeia causam o aumento dos níveis sanguíneos de LDL-colesterol, elevando o risco de arteriosclerose e de doenças cardiovasculares no homem<sup>29,30</sup>. Desta forma, foram preconizados alguns guias dietéticos para a orientação sobre a composição e o consumo adequado de ácidos graxos na dieta humana visando à promoção e manutenção de uma vida saudável. A Organização Mundial de Saúde<sup>31</sup> preconiza que o total de lipídios não deve exceder de 15 a 30% do valor calórico total da dieta, cuja composição de ácidos graxos deve ser aproximadamente de 10% de SFA, 5 a 8% de PUFA n-6 e 1 a 2% de PUFA n-3. O Departamento de Saúde do Reino Unido<sup>32</sup> recomenda que as razões entre os grupos de ácidos graxos deveriam ser maiores que 0,4 para PUFA/SFA e menores que 4 para PUFA n-6/PUFA n-3.

Os ácidos graxos n-6 mais consumidos na dieta humana são o ácido araquidônico (AA), encontrado em carnes, e o ácido linoleico, encontrado em óleos vegetais, sementes e nozes, o qual pode ser convertido a AA pela enzima dessaturase. Já as principais fontes de ácidos graxos



n-3 são os peixes, que contêm os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), além de nozes, sementes e óleos vegetais, que contêm o ácido  $\alpha$ -linolênico, que pode ser convertido a EPA e depois a DHA pela mesma enzima dessaturase que converte o ácido linoleico a AA<sup>28</sup>. Como a conversão dos ácidos graxos n-3 e n-6 depende da mesma série de enzimas, ocorre uma competição entre as famílias n-6 e n-3 pelas enzimas para seu metabolismo, onde o excesso de uma família causa um decréscimo significativo na conversão da outra<sup>24</sup>. Os eicosanóides derivados dos ácidos graxos n-6 são geralmente pró-inflamatórios e pró-agregatórios, enquanto os derivados de n-3 são predominantemente anti-inflamatórios e inibidores da agregação de plaquetas<sup>24,26</sup>.

Os níveis de PUFA n-3 na dieta ocidental são muito baixos, a relação da ingestão de ácidos graxos n-6:n-3 é estimada em 15-20:1<sup>26,27</sup>. Estes ácidos graxos reduzem o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>29,30</sup>, além de serem necessários para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso e visual em fetos e crianças<sup>33</sup>. Estudos epidemiológicos ainda sugerem que o consumo de altos teores de DHA estariam correlacionados com a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis como a doença de Alzheimer<sup>34</sup>.

#### ■ Efeito do processamento e do armazenamento sobre a oxidação lipídica em carne de frango

A oxidação dos constituintes lipídicos é uma reação importante que limita a vida de prateleira de vários alimentos, sendo um dos mecanismos primários da deterioração da qualidade em produtos alimentícios, especialmente de carnes. As alterações na qualidade podem ser percebidas pelas mudanças de sabor, de cor, de textura, de valor nutricional e pela produção de compostos potencialmente tóxicos. Dentre os fatores extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento da oxidação lipídica em carnes estão as condições de processamento, como a moagem, o tratamento térmico, a aplicação de alta pressão, a adição de outros ingredientes a formulação do produto, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e a exposição à luz.

#### ■ Influência do tratamento térmico

O efeito pró-oxidante do tratamento térmico em carne de frango tem sido descrito na literatura<sup>35-43</sup> e atribuído a vários fatores. Dentre eles estão a desnaturação proteica, que pode causar a perda de atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutathione peroxidase e a superóxido

desmutase; a ruptura das membranas celulares, que coloca os ácidos graxos insaturados e o colesterol em contato com espécies pró-oxidantes como os radicais alcoxila e hidroxila e a liberação de ferro pelas metaloproteínas, principalmente pela mioglobina<sup>44-47</sup>. O decréscimo no teor de ferro-heme, e conseqüente aumento no teor de ferro livre, em decorrência do processo de cozimento varia em função do corte do frango, sendo de 7 % no peito, 24 % a 27 % na coxa e 43 % na asa de frango<sup>48</sup>.

A cocção pode aumentar significativamente a oxidação do colesterol, aumentando o conteúdo total dos óxidos de colesterol<sup>43,49-52</sup>, além de também modificar o valor nutricional em relação ao produto original, pela modificação de seu perfil de ácidos graxos<sup>50,52-54</sup>.

A Tabela 1 apresenta o efeito do tratamento térmico e do armazenamento na oxidação do colesterol em carne de frango observado por diferentes autores. Os resultados são apresentados individualmente para cada óxido estudado; entretanto, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura analisa apenas os resultados para os óxidos de colesterol totais. Geralmente, os principais óxidos de colesterol encontrados em carne de frango crua são os mesmos encontrados após o tratamento térmico e posterior armazenamento, sendo que o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e o 5,6- $\beta$ -epoxicolesterol são os óxidos que, em geral, apresentam as maiores concentrações no frango cru<sup>35,37,49-51</sup>. No frango cozido e após o armazenamento, além destes dois óxidos, há um aumento na concentração do 7-cetocolesterol<sup>35,37,49-51,55</sup>. A presença de 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol foi verificada apenas em cortes de coxas de frango<sup>35</sup> e o 25-hidroxicolesterol e o colestanotriol, que são os óxidos considerados com maior potencial de toxicidade, foram encontrados na maioria das amostras, porém, em baixas concentrações<sup>35,37,51,55</sup>.

Embora a composição de ácidos graxos não seja o parâmetro mais importante para detectar o desenvolvimento da oxidação lipídica, estes lipídios, principalmente os poli-insaturados, podem sofrer alterações decorrentes da oxidação. O teor de lipídios totais em cortes de peito de frango sem pele é de aproximadamente 1,7%, sendo constituído por 36,6% de SFA, 32,5% MUFA e 30,8% PUFA. Os ácidos graxos saturados mais abundantes são o palmítico, seguido do esteárico. Entre os monoinsaturados os maiores percentuais observados são do ácido palmítico e do ácido oleico; e os principais poli-insaturados são o linoleico, o AA e o DHA<sup>56</sup>. O teor de lipídios totais da carne cozida é afetado pelo método de cocção e pode aumentar cerca de 2 a 3

**Tabela 1.** Efeito do tratamento térmico e da estocagem na formação de óxidos de colesterol em frango e produtos de frango

Produto	Tratamento Térmico	Armazenamento	Óxidos de colesterol		Referência
			Cru	Cozida (final)	
Peito + 1% sal + 5% água <sup>a</sup> (variação do teor de $\alpha$ -tocoferol na dieta)	forno convencional 160 °C/40 min.	4 °C, luz fluorescente, 12 dias	não realizado	25-OH (0,10-0,14) 7-ceto (0,17-0,39)	Galvin et al. <sup>55</sup>
			não realizado	25-OH (0,27-1,04) 7-ceto (0,17-0,39)	
Coxa + 1% sal + 5% água <sup>a</sup> (variação do teor de $\alpha$ -tocoferol na dieta)			não realizado	25-OH (0,23-0,56) 7-ceto (0,45-0,73)	
			não realizado	25-OH (0,74-3,47) 7-ceto (0,45-0,73)	
Hambúrguer <sup>b</sup> (comercial)	microondas 3 min/900 W Temperatura interna: 100°C	não realizado	7 $\beta$ -OH (2,14) 7-ceto (1,87)	7 $\alpha$ -OH (12,67) 7 $\beta$ -OH (6,43) 7-ceto (4) $\alpha$ -EP (1,53)	Echarte et al. <sup>50</sup>
			frito com 10 mL de azeite de oliva a 180 °C/3 min. de cada lado Temperatura interna: 85-90°C	7 $\alpha$ -OH (2,93) 7 $\beta$ -OH (2,25) 7-ceto (2,53) $\alpha$ -EP (0,65) triol (2,39)	
Coxa <sup>a</sup> (variação no teor de $\alpha$ -tocoferol e $\beta$ -caroteno e na fonte de gordura na dieta)	Coção em sacos de polietileno em banho de água a 85 °C / 50min Temperatura interna: 80°C	não realizado	7 $\alpha$ -OH (0,01-0,21) 7 $\beta$ -OH (0-0,11) 7-ceto (0-0,13) $\alpha$ -EP (0-0,05) $\beta$ -EP (0-0,15) 20 $\alpha$ -OH (0-0,05)	7 $\alpha$ -OH (0,14-1,41) 7 $\beta$ -OH (0,12-1,50) 7-ceto (0,15-1,01) $\alpha$ -EP (0,03-0,51) $\beta$ -EP (0,21-0,84) 20 $\alpha$ -OH (0-0,14) 25-OH (0-0,01) triol (0-0,06)	Maraschiello et al. <sup>35</sup>
				não realizado	

<sup>a</sup> óxidos de colesterol expressos em  $\mu\text{g/g}$ ; <sup>b</sup> óxidos de colesterol expressos em  $\mu\text{g/g}$  de lipídio.  
7-ceto = 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -OH = 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol, 7 $\alpha$ -OH = 7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol,  $\alpha$ -EP = 5,6 $\alpha$ -epoxicoolesterol, 25-OH = 25-hidroxicoolesterol, triol = colestanoetriol.

**Continuação Tabela 1.** Efeito do tratamento térmico e da estocagem na formação de óxidos de colesterol em frango e produtos de frango

Produto	Tratamento Térmico	Armazenamento	Óxidos de colesterol		Referência	
			Cru	Cozida (final)		
Peito inteiro <sup>b</sup>	grelhada 180 °C / 1,5 min. de cada lado com 9mL de óleo de girassol Temperatura interna: 85-90 °C  assada 220 °C / 10 min. de cada lado Temperatura interna: 95-100°C	-18 °C, 13 meses aeróbica	7 $\alpha$ -OH (0,20-1,31) 7 $\beta$ -OH (0,50-1,49) 7-ceto (0,53-0,55) $\alpha$ -EP (0,20-0,25) $\beta$ -EP (2,40-2,69) 25-OH (0,12-0,23) triol (0,59-0,92)	não realizado	7 $\alpha$ -OH (0,27-2,47) 7 $\beta$ -OH (0,89-6,32) 7-ceto (1,00-12,58) $\alpha$ -EP (0,21-2,43) $\beta$ -EP (1,71-3,96) 25-OH (0,21-0,35) triol (0,61-0,79)	Conchillo et al. <sup>51</sup>
			7 $\alpha$ -OH (0,83-1,05) 7 $\beta$ -OH (3,47-20,35) 7-ceto (0-2,78) $\beta$ -EP (<0,05)	7 $\alpha$ -OH (1,44-8,1) 7 $\beta$ -OH (10,10-61,7) 7-ceto (2,86-9,6) $\beta$ -EP (0,87-1,1)	7 $\alpha$ -OH (1,55-33,8) 7 $\beta$ -OH (18,73-174,2) 7-ceto (7,38-39,7) $\beta$ -EP (1,62-3,6)	
Peito inteiro <sup>b</sup>	grelhada 180 °C / 1,5 min. de cada lado Temperatura interna: 85-90 °C  assada 220 °C / 10 min. de cada lado Temperatura interna: 95-100°C	4 °C, 6 dias	7 $\alpha$ -OH (0,22) 7 $\beta$ -OH (0,39) 7-ceto (0,06) $\beta$ -EP (1,33) 25-OH (0,19) triol (0,67)	7 $\alpha$ -OH (1,93) 7 $\beta$ -OH (2,86) 7-ceto (2,42) $\alpha$ -EP (0,54) $\beta$ -EP (4,08) 25-OH (0,35) triol (0,64)	7 $\alpha$ -OH (12,58) 7 $\beta$ -OH (30,77) 7-ceto (21,46) $\alpha$ -EP (4,31) $\beta$ -EP (21,78) 25-OH (0,53) triol (0,92)	Conchillo et al. <sup>37</sup>
			7 $\alpha$ -OH (1,93) 7 $\beta$ -OH (2,86) 7-ceto (2,42) $\alpha$ -EP (0,54) $\beta$ -EP (4,08) 25-OH (0,35) triol (0,64)	7 $\alpha$ -OH (1,50) 7 $\beta$ -OH (2,29) 7-ceto (2,27) $\alpha$ -EP (0,49) $\beta$ -EP (4,08) 25-OH (0,24) triol (0,66)	7 $\alpha$ -OH (12,28) 7 $\beta$ -OH (22,66) 7-ceto (30,86) $\alpha$ -EP (4,04) $\beta$ -EP (17,43) 25-OH (0,46) triol (0,87)	

<sup>a</sup> óxidos de colesterol expressos em  $\mu\text{g/g}$ ; <sup>b</sup> óxidos de colesterol expressos em  $\mu\text{g/g}$  de lipídio.  
 7-ceto = 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -OH = 7 $\beta$ -hidroxicoolesterol, 7 $\alpha$ -OH = 7 $\alpha$ -hidroxicoolesterol,  $\alpha$ -EP = 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 25-OH = 25-hidroxicoolesterol, triol = colestano-triol.

vezes em relação à carne crua, quando comparado em base úmida, devido à perda de água durante a cocção. A composição de ácidos graxos da carne de frango assado, ou cozido ao vapor, é semelhante. Porém, quando comparada à carne crua, nota-se uma diminuição nas concentrações de ácidos graxos insaturados, principalmente devido à perda de PUFA com 20 e 22 átomos de carbono na cadeia<sup>56</sup>. No entanto, o período de armazenamento e o tratamento térmico não alteraram a composição de ácidos graxos de produtos processados de carne de frango<sup>57,58</sup>.

A oxidação do colesterol é altamente influenciada pela composição de ácidos graxos, principalmente dos ácidos graxos insaturados. Os tecidos com maiores teores de PUFA promoveriam uma maior taxa de formação de radicais livres, acelerando a oxidação do colesterol<sup>35,50,55</sup>. Em um sistema modelo, após reduzir o grau de insaturação da composição dos ácidos graxos, observou-se um prolongamento do período de indução da oxidação do colesterol. Porém, a velocidade de oxidação do colesterol na fase de formação dos óxidos de colesterol, após o período de indução, não foi afetada pela proporção de ácidos graxos altamente insaturados presentes no sistema modelo<sup>59</sup>.

Por outro lado, existem evidências de que os ácidos graxos insaturados, em especial os PUFA, seriam responsáveis por exercerem um efeito protetor sobre o colesterol frente à oxidação, devido ao fato de se oxidarem preferencialmente<sup>36,39</sup>. Em um estudo comparativo entre três métodos de cocção (assamento em forno, cozimento em água fervente e fritura sob imersão em óleo de soja) por 20 minutos o peito de frango apresentou maiores concentrações de óxidos de colesterol total, tanto na amostra crua quanto nas amostras termicamente processadas, quando comparado com o corte de coxa de frango, com exceção do frango assado, onde o teor total de óxidos de colesterol foi maior na coxa<sup>41</sup>.

Após a cocção, é necessário armazenar a carne em temperatura baixa para minimizar a oxidação lipídica, porém, mesmo sob temperaturas de congelamento a oxidação lipídica é apenas retardada, mas não eliminada<sup>60</sup>.

#### ■ Influência do processamento sob alta pressão

O conceito da teoria dos obstáculos foi introduzido por Leistner<sup>61</sup> e é baseado na aplicação de fatores preservativos combinados, os obstáculos, com a finalidade de garantir a segurança microbiológica, a estabilidade química e a qualidade sensorial e nutricional dos produtos alimentícios. Dentre os processos tecnológicos

emergentes, o uso de alta pressão hidrostática é uma das técnicas mais promissoras para preservação de alimentos<sup>62</sup>. Geralmente, o tratamento com alta pressão resulta na inativação de microrganismos, podendo afetar também a cinética de reações enzimáticas, causando apenas alterações imperceptíveis no sabor e odor dos alimentos. Entretanto, também pode ocasionar efeitos negativos como alterações de cor, de textura e de estrutura, além de induzir a oxidação lipídica em carnes, dependendo do nível de pressão e de tempo aplicados<sup>38,40,42,63-66</sup>.

O efeito da alta pressão na formação de radicais livres em cortes de peito e de coxa de frango foi correlacionado com a estabilidade oxidativa destes músculos e com a adição de sal (cloreto de sódio). Verificou-se que a geração de radicais livres ocorreu até mesmo após o emprego de pressões moderadas (200 MPa) por apenas 5 minutos, havendo aumento significativo na formação de radicais livres quando houve adição de sal à carne e também em função da natureza oxidativa do tecido (peito ou coxa). Os autores encontraram a máxima formação de radicais livres a pressões de 1000 MPa e 600 MPa, para peito e coxa, respectivamente<sup>65</sup>.

Atualmente, resultados positivos têm sido observados em relação ao uso de condimentos, de extratos vegetais, de agentes quelantes e de clara de ovo para controlar a oxidação lipídica, induzida pela alta pressão, em carne de frango. Entretanto, o efeito antioxidante depende da magnitude da pressão aplicada<sup>38,42</sup> e do tratamento térmico subsequente<sup>40</sup>.

#### ■ Uso de condimentos como fontes de antioxidantes: sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e alho (*Allium sativum*, L.)

O uso de antioxidantes sintéticos para prolongar a vida de prateleira de carnes e produtos cárneos é comum nas indústrias de alimentos. No entanto, observa-se uma demanda cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, devido à crescente preocupação com a saúde. Assim, o uso de condimentos como antioxidantes naturais tem sido objeto de estudo em pesquisas que empregam diversas matrizes alimentares como hambúrgueres, almôndegas, embutidos, desidratados e cortes marinados<sup>42,43,67-76</sup>.

Os antioxidantes podem atuar por diversos mecanismos protegendo os lipídios alvo dos iniciadores da oxidação ou interrompendo a fase de propagação. O principal mecanismo de ação de compostos fenólicos, naturalmente presentes nos condimentos em geral, é

a inativação de radicais livres de lipídios, diminuindo a produção de espécies reativas e, conseqüentemente, interrompendo a fase de propagação da autooxidação lipídica<sup>77</sup>.

A atividade dos antioxidantes em sistemas alimentícios depende não apenas da reatividade química do antioxidante, ou seja, de aprisionar ou sequestrar radicais livres, quelar metais, entre outros, mas também de fatores como a localização física, a interação com outros componentes do alimento, além das condições ambientais. Desta forma, a eficácia de cada condimento ou erva aromática varia nos diferentes tipos de alimentos, não sendo possível estimar a ação antioxidante destes compostos a partir dos resultados obtidos em outros substratos<sup>78</sup>. Além disso, o uso dos antioxidantes naturais deve ser compatível sensorialmente com o produto no qual foi adicionado<sup>79</sup>.

#### ■ Sálvia (*Salvia officinalis*, L.)

A sálvia pertence à família Lamiaceae tendo sido extensivamente estudada e reconhecida por sua capacidade antioxidante relacionada aos seus compostos fenólicos<sup>80-83</sup>. Cuvelier et al.<sup>84</sup> identificaram os constituintes antioxidantes da sálvia como sendo carnosol, rosmadial, ácido carnosínico, rosmanol e epirosmanol, previamente encontrados em alecrim, e notadamente conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

A ação da sálvia como antioxidante em alimentos foi inicialmente verificada por Chipault et al.<sup>78</sup> em maionese, banha, massa de torta, molho para salada e carne suína. Um controle eficaz da oxidação lipídica foi obtido através da adição de 0,05% de sálvia em hambúrgueres de carne suína<sup>72</sup>; de um extrato etanólico de sálvia em carne de porco crua, pré-tratada com cloreto de sódio durante armazenamento sob congelamento<sup>69</sup>; de uma mistura de alecrim e sálvia frescos (0,3% + 0,3%, p.p.) em hambúrgueres de carne congelados<sup>68</sup> e do uso de extratos puros de sálvia e de alecrim, bem como da mistura dos dois extratos, em um sistema modelo de carne<sup>85</sup>. Entretanto, estes extratos, quando adicionados a quantidades iguais de vitamina E, não demonstraram efeito sinérgico em comparação à vitamina E pura. A adição de 0,1% de sálvia em peito de frango foi eficaz em minimizar e retardar a oxidação dos lipídios e do colesterol durante o processamento térmico e o armazenamento a -18°C, sendo capaz de parcialmente contrapor os efeitos pró-oxidantes da adição de 0,5% de sal<sup>43</sup>. Nesta mesma concentração, a sálvia também teve ação antioxidante

em peito de frango submetido à alta pressão durante o armazenamento a 5°C por 15 dias<sup>42</sup>.

Outra forma de aplicação da sálvia como antioxidante nos alimentos que vem sendo estudada é através da adição de seu óleo essencial. A adição de 0,1% de óleo essencial de sálvia em uma formulação de patê de fígado suíno reduziu a degradação dos PUFA e a formação de compostos voláteis provenientes da oxidação lipídica durante o armazenamento a 4°C por 90 dias<sup>76</sup>, enquanto 3% de óleo essencial de sálvia adicionados a carne homogeneizada foram eficientes no controle da oxidação lipídica durante a cocção e armazenamento a 4°C por 12 dias<sup>83</sup>.

Através do uso da espectroscopia de ressonância paramagnética (ESR), a formação de radicais livres foi utilizada para determinação do mecanismo de ação da sálvia em um sistema modelo de carne de frango submetido à alta pressão, verificando-se que o principal mecanismo do efeito protetor da sálvia é sua capacidade de desativar os radicais livres na fase lipídica<sup>42</sup>.

#### ■ Alho (*Allium sativum*, L.)

Uma vasta gama de funções biológicas tem sido associada ao consumo de alho, entre elas, a ação antimicrobiana<sup>86,87</sup>; antitrombótica<sup>88</sup>; anticancerígena<sup>89,90</sup>; antiaterosclerótica<sup>91,92</sup>; antioxidante<sup>93,94</sup>; fortalecedora do sistema imunológico<sup>95,96</sup>; hipolipidêmica e hipoglicêmica<sup>97-99</sup> e hipotensora<sup>100</sup>. Recentemente, Benavides et al.<sup>101</sup> verificaram que a liberação de H<sub>2</sub>S proveniente de polissulfitos durante a metabolização de compostos orgânicos derivados de alho seria a responsável por uma ação vasodilatadora cardioprotetora.

Os vegetais do gênero *Allium*, como o alho e a cebola, são extensamente utilizados na culinária brasileira e têm como característica marcante seu odor característico e sabor pungente que são propiciados pelos compostos organossulfurados presentes em sua composição.

A atividade antioxidante dos vegetais do gênero *Allium* tem sido atribuída, principalmente, a diversos compostos sulfúricos<sup>94</sup>. Por outro lado, Fernández-López et al.<sup>102</sup> avaliaram o efeito antioxidante de um extrato hidrossolúvel de alho disponível no mercado através do método RANCIMAT e observaram efeito pró-oxidante. No entanto, a atividade antioxidante do alho depende dos compostos presentes no extrato, os quais podem diferir em função dos solventes que foram usados na extração e também da concentração usada em cada estudo<sup>93,94</sup>.



Os trabalhos que avaliam os efeitos da adição de alho frente à oxidação de produtos alimentícios são escassos e apresentam resultados divergentes. Por um lado, resultados positivos, indicando uma atividade antioxidante relacionada à adição de alho ou extratos derivados de alho, foram verificados em carne moída adicionada de quatro compostos organosulfurados derivados de alho (dialil sulfito, dialil dissulfito, S-etil cisteína e N-acetil cisteína) resultando no retardo da oxidação lipídica e também da oximioglobina, mostrando-se mais eficiente do que a adição de  $\alpha$ -tocoferol<sup>74</sup>. Em adição, em salsichas de frango cruas durante o armazenamento a 3°C por 21 dias, a adição de alho fresco, alho desidratado e óleo de alho em diversas concentrações, resultou em valores de TBARS (substâncias reativas com o ácido tio-barbitúrico) iguais ou menores a salsichas adicionadas do antioxidante sintético BHA (0,01%)<sup>75</sup>. Entretanto, a formulação destas salsichas de frango continha outras substâncias como fosfato de sódio, glutamato monossódico, nitrato de sódio e outros condimentos como pimenta branca, noz moscada, sálvia e pimenta da Jamaica e, como foi verificado por Mariutti et al.<sup>42</sup>, a sálvia é capaz de conter parcialmente o efeito pró-oxidante causado pelo alho, permanecendo, portanto, a dúvida quanto à atribuição do efeito antioxidante ao alho.

Em outro trabalho, a adição de suco de alho em carne de ovelha reduziu o desenvolvimento da rancidez em comparação a carne pura<sup>67</sup>. Por outro lado, um efeito pró-oxidante foi observado com a adição de 1% de alho fresco em bifes embalados a vácuo e submetidos à irradiação após 4 semanas de armazenamento a 4°C<sup>73</sup>. Além disso, em salsichas chinesas semidesidratadas<sup>71</sup> e em salsichas secas fermentadas tipo *chorizo*<sup>70</sup>, a adição de alho (tipo não especificado) à formulação não resultou em diferenças significativas quando os valores de TBARS foram comparados com as amostras preparadas com a formulação controle. A adição de 0,1% de alho em peito de frango apresentou comportamento variável de acordo com a metodologia utilizada (formação de TBARS, de hexanal, de pentanal, de malonaldeído e de óxidos de colesterol e degradação de ácidos graxos e de vitamina E), sugerindo que o alho não tem efeito antioxidante nesta matriz, podendo até mesmo acelerar a oxidação lipídica durante o armazenamento a -18°C<sup>43</sup>. Nesta mesma concentração, o alho agiu como fator pró-oxidante em peito de frango submetido à alta pressão durante o armazenamento a 5°C por 15 dias<sup>42</sup>.

## CONCLUSÃO

O tratamento térmico e a aplicação de alta pressão são reconhecidamente eficientes na preservação de alimentos, porém, para a carne de frango, estes métodos também são fatores que podem desencadear ou acelerar a oxidação lipídica, causando alterações na qualidade sensorial e nutricional do produto, além da formação de compostos potencialmente prejudiciais à saúde, como os óxidos de colesterol. O uso de condimentos pode ser considerado uma forma eficiente para minimizar ou retardar a oxidação lipídica causada por estes fatores, prolongando sua vida de prateleira e preservando suas características.

A adição de sálvia tem apresentado resultados positivos nos diversos tipos de alimentos em que foi testada, sendo capaz de reduzir os efeitos causados pelo processamento e por outros fatores pró-oxidantes, como a adição de cloreto de sódio. Os compostos responsáveis pela ação antioxidante da sálvia e seu mecanismo de ação já são conhecidos.

Os estudos sobre a ação do alho na oxidação lipídica em alimentos são mais escassos e controversos. As diversas condições utilizadas nos diferentes trabalhos com a adição de alho em produtos alimentícios não permitem uma comparação direta entre estes, sugerindo que a ação do alho seja extremamente dependente da matriz estudada, da concentração e forma de adição do alho, dentre outros fatores. Os compostos sulfurados presentes no alho seriam os responsáveis pela sua possível ação antioxidante, porém, o provável mecanismo de ação permanece desconhecido. A necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o comportamento do alho frente à oxidação lipídica, bem como de seu mecanismo de ação é evidente.

---

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

---

## REFERÊNCIAS

1. Paniangvait P, King AJ, Jones AD, German BG. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J Food Sci* 1995; 60(6): 1159-74.
2. Lercker G, Rodriguez-Estrada MT. Cholesterol oxidation mechanisms. In: Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP,

- editores. Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects. Champaign: Ed. Springer 2002. p. 1-25.
- Hur SJ, Park GB, Joo ST. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control* 2007; 18(8): 939-47.
  - Vine DF, Croft KD, Beilin LJ, Mamo JCL. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. *Lipids* 1997; 32(8): 887-93.
  - Bascoul J, Domergue N, Mourot J, Derby G, Crastes de Paulet A. Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6 $\alpha$ -epoxy-5 $\alpha$ -cholesta-3 $\beta$ -ol by the male wistar rat. *Lipids* 1986; 21(12): 744-7.
  - Peng SK, Taylor CB, Hill JC, Morin RJ. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis* 1985; 54(2): 121-33.
  - Hodis HN, Crawford DW, Sevanian A. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1991; 89(2/3): 117-26.
  - Brown O, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, 142(1): 1-28.
  - Garcia-Cruzet S, Carpenter KLH, Codony R, Guardiola F. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. In: Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, editores. Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects. Champaign: Ed. Springer 2002 p. 241-77.
  - Sevanian A, Peterson AR. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem Toxicol* 1986 24(10/11): 1103-10.
  - Ohtani K, Miyabara K, Okamoto E, Kamel M, Matsui-Yuasa I. Cytotoxicity of 7cetocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. *Biosci Biotech Bioch* 1996 60(12): 1989-93.
  - Ohtani K, Terada E, Kamel M, Matsui-Yuasa I. Cytotoxicity of cholestane 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol on cultured intestinal crypt cells (IEC-6). *Biosci Biotech Bioch* 1997 61(4): 573-6.
  - Lizard G, Lemaire S, Monier S, Gueldry S, Néel D, Gambert P. Induction of apoptosis and of interleukin-1 $\beta$  secretion by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Letters* 1997 419(2/3): 276-80.
  - Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, et al. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol* 2005 21(2): 97-114.
  - Smith LL, Johnson BH. Biological activities of oxysterols. *Free Radical Bio Med* 1989 7(3): 285-332.
  - Osada K. Cholesterol oxidation products: other biological effects. In: Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, editores. Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects. Champaign: Ed. Springer 2002 p. 278-318.
  - Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem* 2002 13(12): 700-10.
  - Kolsch H, Lutjohann D, Tulke A, Bjorkhem I, Rao ML. The neurotoxic effect of 24hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Research* 1999 818(1): 171-5.
  - Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients *J Lipid Res* 2000 41(2): 195-8.
  - Girao H, Mota MC, Ramalho J, Pereira P. Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res* 1998 66(5): 645-52.
  - Ferderbar S, Pereira EC, Apolinário E, Bertolami MC, Faludi A, Monte O, et al. Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes *mellitus*. *Diabetes Metab Res Rev* 2007 23(1): 35-42.
  - Endo K, Tomokazu O, Saiki A, Ban N, Ohira M, Koide N, et al. Determination of serum 7-ketocholesterol concentrations and their relationships with coronary multiple risks in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pr* 2008 80(1): 63-8.
  - Finocchiaro ET, Richardson T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. *J Food Protec* 1983 46(10): 917-25.
  - Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 2008 47(2): 147-55.
  - Keys A, Parlin RW. Serum cholesterol response to changes in dietary lipids. *Am J Clin Nutr* 1966 19(3): 175-81.
  - Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999 70(3): 560S-9S.
  - Simopoulos AP. The importance of the ratio of *omega*-6/*omega*-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002 56(8): 365-79.
  - DeFilippis AP, Sperling LS. Understanding *omega*-3's. *Am Heart J* 2006 151(3): 564-70.
  - Judd JT, Clevidence BA, Muesing RA, Wittes J, Sunkin ME, Podczasy JJ. Dietary *trans* fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1994 59(4): 861-8.
  - Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Kris-Etherton P, Muesing RA, Iwane M. Dietary *cis* and *trans* monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. *Lipids* 2002 37(2): 123-31.
  - World Health Organization (Suíça). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO 2003.
  - Department of Health (UK). Report on health and social subjects n° 46. Nutritional aspects of cardiovascular disease. Her Majesty's Stationery Office: Londres 1994.
  - Innis SM. Fatty acids and early human development. *Early Hum Dev* 2007 83(12): 761-6.
  - Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Kriem B, Olivier J, Pillot T, et al. Towards a nutritional approach for prevention of Alzheimer's disease: Biochemical and cellular aspects. *J Neurol Sci* 2007 262(1/2): 27-36.
  - Maraschiello C, Esteve E, García-Regueiro JA. Cholesterol oxidation in meat from chickens fed  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene-supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids* 1998 33(7): 705-13.
  - Grau A, Guardiola F, Grimpa S, Barroeta AC, Codony R. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poult Sci* 2001 80(11): 1630-42.
  - Conchillo A, Ansorena D, Astiasarán I. Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *J Food Prot* 2003 66(5): 840-6.
  - Beltran E, Pla R, Yuste J, Mor-Mur M. Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Sci* 2004 66(3): 719-25.

39. Bonoli M, Caboni MF, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G. Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. *Food Chem* 2007 101(4): 1327-37.
40. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH. Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2007 8(1): 24-9.
41. Mariutti LRB, Nogueira GC, Bragagnolo N. Incidência de óxidos de colesterol em cortes de frango submetidos a diferentes tratamentos térmicos. In: Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras. Florianópolis: Sección Latinoamericana de la American Oil Chemists' Society, 2007: LAAOCS 010, 1-6.
42. Mariutti LRB, Orlien V, Bragagnolo N, Skibsted LH. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *Eur Food Res Technol* 2008 227(2): 337-44.
43. Mariutti LRB. Efeito da adição de sálvia e alho na oxidação lipídica em carne de frango [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2009 171pp.
44. Rhee KS. Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol* 1998 42(6): 127-32.
45. Decker EA, Xu Z. Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technol* 1998 52(10): 54-9.
46. Monahan FJ. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. In: Decker E, Faustman C, Lopez-Bote CJ, editores. Antioxidants in muscle foods – Nutritional strategies to improve quality. Canada: Ed. A John Wiley & Sons Inc.; 2000 p. 3-24.
47. Erickson MC. Lipid oxidation of muscle foods. In: Akoh CC, Min DB, editores. Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology 2<sup>nd</sup> ed. Nova Iorque: Ed. Marcel Dekker Inc.; 2002. Disponível em [www.foodnetbase.com](http://www.foodnetbase.com), acessado em 23/05/2006.
48. Lombardi-Boccia G, Martinez-Dominguez B, Aguzzi A. Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *J Food Sci* 2002 67(5): 1738-41.
49. Lee JI, Kang S, Ahn DU, Lee M. Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. *Poult Sci* 2001 80(1): 105-8.
50. Echarte M, Ansorena D, Astiasarán I. Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef patties. *J Agric Food Chem* 2003 51(20): 5941-5.
51. Conchillo A, Ansorena D, Astiasarán I. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J Sci Food Agric* 2005 85(1): 141-6.
52. Conchillo A, Ansorena D, Astiasarán I. The effect of cooking and storage on the fatty acid profile of chicken breast. *Eur J Lipid Sci Technol* 2004 106(5): 301-6.
53. Nogueira GC, Mariutti LRB, Bragagnolo N. Alteração da relação  $\omega 6/\omega 3$  de coxas de frango submetidas a diferentes métodos de cozimento. In: Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras. Florianópolis: Sección Latinoamericana de la American Oil Chemists' Society, 2007: LAAOCS 002, 1-6.
54. Nogueira GC, Mariutti LRB, Bragagnolo N. Relação entre o método de cozimento e a composição de ácidos graxos em peito de frango. In: Anais do XII Congresso Latino-Americano de Óleos e Gorduras. Florianópolis: Sección Latinoamericana de la American Oil Chemists' Society, 2007: LAAOCS 015, 1-6.
55. Galvin K, Morrisey PA, Buckley DJ. Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation. *Meat Sci* 1998 48(1/2): 1-9.
56. Cantor AH, Decker EA, Collins VP. Fatty acids in poultry and egg products. In: Chow CK, editor. Fatty acids in foods and their health implications 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. Disponível em [www.foodnetbase.com](http://www.foodnetbase.com), acessado em 15/10/2008.
57. Baggio SR, Bragagnolo N. Cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *Food Chem* 2006 95(4): 611-9.
58. Baggio SR, Bragagnolo N. Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in Brazilian processed chicken products. *Ital J Food Sci* 2006 18(2): 199-208.
59. Li N, Ohshima T, Shozen K, Ushio H, Koizumi C. Effects of the degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 1994 71(6): 623-7.
60. Pikul J, Leszczynski DE, Bechtel PJ, Kummerow FA. Effect of frozen storage and cooking on lipid oxidation in chicken meat. *J Food Sci* 1984 49(3): 838-43.
61. Leistner L. Hurdle effect and energy saving. In: Downey WK, editor. Food Quality and Nutrition. Londres: Applied Science Publishers; 1978.
62. Leistner L, Gould GW. Hurdle technologies – combination treatments for food stability, safety and quality. Nova Iorque: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2002.
63. Orlien V, Hansen E, Skibsted LH. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *Eur Food Res Technol* 2000 211(2): 99-104.
64. Wiggers SB, Kroger-Ohlsen MV, Skibsted LH. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast during chill storage and subsequent heat treatment: effect of working pressure, packaging atmosphere and storage time. *Eur Food Res Technol* 2004 219(2): 167-70.
65. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH. Combined effect of salt addition and high-pressure processing on formation of free radicals in chicken thigh and breast muscle. *Eur Food Res Technol* 2006 223(5): 669-73.
66. Ma HJ, Ledward DA, Zamri AI, Frazier RA, Zhou GH. Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. *Food Chem* 2007 104(4): 1575-9.
67. Jurdi-Haldeman D, Macneil JH, Yared DM. Antioxidant Activity of Onion and Garlic Juices in Stored Cooked Ground Lamb. *J Food Protect* 1987 50(5): 411-3.
68. Pizzocaro F, Senesi E, Babbini G. Effetto protettivo di salvia e rosmarino freschi su hamburger surgelati di carne bovina. *Industrie Alimentari* 1994 33(324): 289-94.
69. El-Alim SSLA, Lugasi A, Hóvári J, Dworschák E. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *J Sci Food Agric* 1999 79(2): 277-85.
70. Aguirrezabal MM, Mateo J, Dominguez MC, Zumalacarregui JM. The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Sci* 2000 54(1): 77-81.
71. Sun YM, Ockerman HW, Marriott NG. Garlic in Chinese sausage. *J Muscle Foods* 2000 11(1): 35-43.
72. Mc Carthy TL, Kerry JP, Kerry JF, Lynch PB, Buckley DJ. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci* 2001 57(2): 177-84.
73. Wong PYY, Kitts DD. The effects of herbal pre-seasoning on microbial and oxidative changes in irradiated beef steaks. *Food Chem* 2002 76(2): 197-205.



74. Yin MC, Cheng WS. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Sci* 2003 63(1): 23-8.
75. Sallam KI, Ishloroshi M, Samejima K. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensm Wiss Technol* 2004 37(8): 849-55.
76. Estevez M, Ramirez R, Ventanas S, Cava R. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. *Lebensm Wiss Technol* 2007 40(1): 58-65.
77. Gordon MH. Factors affecting lipid oxidation. In: Steel R, editor. *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Boca Raton: CRC Press; 2004. Disponível em [www.foodnetbase.com](http://www.foodnetbase.com), acessado em 15/10/2008.
78. Chipault JR, Mizuno GR, Lundberg WO. The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technol* 1956 10(5): 209-11.
79. Lai S, Gray JJ, Smith DM, Booren AM, Crackel RL, Buckley DJ. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *J Food Sci* 1991 56(3): 616-20.
80. Cuppett SL, Hall III CA. Antioxidant activity of the Labiatae. *Adv Food Nutr Res* 1998 42: 245-71.
81. Madsen HL, Bertelsen G. Spices as antioxidants. *Trends Food Sci Tech* 1995 6(8): 271-7.
82. Mariutti LRB, Barreto GPM, Bragagnolo N, Mercadante AZ. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 2008 51(6): 1225-32.
83. Fasseas MK, Mountzouris KC, Tarantilis PA, Polissiou M, Zervas G. Antioxidant activity in meat treated with orégano and sage essential oils. *Food Chem* 2007 106(3): 1188-94.
84. Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 1994 42(3): 665-9.
85. Wong JW, Hashimoto K, Shibamoto T. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model system. *J Agric Food Chem* 1995 43(10): 2707-12.
86. Krest I, Glodek J, Keusgen M. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J Agric Food Chem* 2000 48(8): 3753-60.
87. Kyung KH, Kim MH, Park MS, Kim YS. Alliinase-independent inhibition of *Staphylococcus aureus* B33 by heated garlic. *J Food Sci* 2002 67(2): 780-5.
88. Block E, Ahmad S, Catalfamo JL, Jain MK, Apitzcastro R. Antithrombotic Organosulfur Compounds from Garlic -Structural, Mechanistic, and Synthetic Studies. *J Am Chem Soc* 1986 108(22): 7045-55.
89. Hirsch K, Danilenko M, Giat J, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D, Levy J, Sharoni Y. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer* 2000 38(2): 245-54.
90. Mousa AS. Discovery of angiogenesis inhibition by garlic ingredients: Potential anticancer benefits. *FASEB J* 2001 15(4): A117.
91. Orekhov AN, Tertov VV. *In vitro* effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells. *Lipids*. 1997; 32(10): 1055-60.
92. Srinivasan K, Sambaiiah K, Chandrasekhara N. Spices as beneficial hypolipidemic food adjuncts: a review. *Food Rev Int*. 2004; 20(2): 187-220.
93. Yin MC, Cheng W. Antioxidant activity of several *Allium* members. *J Agric Food Chem* 1998 46(10): 4097-101.
94. Nuutila M, Puupponen-Pimiä R, Aarni M, Oksman-Caldentey KM. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem* 2003 81(4): 485-93.
95. Liu CT, Chen HW, Sheen LY, Kung YL, Chen PCH, Lii CK. Effect of garlic oil on hepatic arachidonic acid content and immune response in rats. *J Agric Food Chem* 1998 46(11): 4642-7.
96. Kang NS, Moon EY, Cho CG, Pyo S. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *Nutr Res* 2001 21(4): 617-26.
97. Zhang XH, Lowe D, Giles P, Fell S, Connock MJ, Maslin DJ. Gender may affect the action of garlic oil on plasma cholesterol and glucose levels of normal subjects. *J Nutr* 2001 131(5): 1471-8.
98. Lawson LD, Wang ZJ, Papadimitriou D. Allicin release under simulated gastrointestinal conditions from garlic powder tablets employed in clinical trials on serum cholesterol. *Planta Medica*. 2001; 67(1): 13-8.
99. Singh DK, Porter TD. Inhibition of sterol 4 alpha-methyl oxidase is the principal mechanism by which garlic decreases cholesterol synthesis. *J. Nutr* 2006 136(3): 759S-64S.
100. Ali M, Al-Qattan KK, Al-Enezi F, Khanafer RMA, Mustafa T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostag Leukot Ess* 2000 62(4): 253-9.
101. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VM, Doeller JE, Kraus DW. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *PNAS* 2007 104(46): 17977-82.
102. Fernández-López J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Pérez-Alvarez JA, Kuri V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Sci* 2005 69(3): 371-80.

# Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil

Comparison of analytical methods in the determination of lipids and polyunsaturated fatty acids by gas chromatography in infant formula

RIALA6/1184

Mahyara Markievicz Mancio KUS<sup>1\*</sup>, Sabria AUED-PIMENTEL<sup>2</sup>, Jorge MANCINI-FILHO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Rua Boa Vista, 128, Centro, Mogi das Cruzes, SP, Brasil, CEP 08717-140, e-mail: mahyarakus@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Laboratório de Lipídeos, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 10.02.2009 – Aceito para publicação: 26.03.2009

## RESUMO

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia de longa participam em diversos processos fisiológicos e metabólicos no organismo humano, além de serem importantes na nutrição infantil. Os ácidos graxos são suplementados em fórmulas infantis utilizadas como substituto de leite materno. A quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, em virtude da presença de vários sítios reativos na molécula, requer processos de extração da gordura em condições brandas. No presente trabalho foram comparadas as metodologias analíticas para determinação de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil. Nessa análise foi utilizada uma amostra de fórmula infantil (NIST) e foram empregadas as metodologias descritas nas Normas do Instituto Adolfo Lutz e pela AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando-se diferentes padrões interno e fatores de correção do detector de ionização em chama. Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados obtidos por meio de diferentes métodos de extração de gordura. As menores taxas de dispersão (%CV) de ácidos graxos polinsaturados foram obtidas pela metodologia oficial AOAC, que indica a preservação desses componentes, porém com menor recuperação dos lipídios. O uso de padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0 e de fator de correção teórico do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno mostrou-se como o mais adequado para efetuar o cálculo dos ácidos graxos polinsaturados.

**Palavras-chave.** ácidos graxos polinsaturados, fórmula infantil, método analítico, cromatografia gasosa, lipídeos.

## ABSTRACT

Long chain polyunsaturated fatty acids are involved in several physiological and metabolic processes of human organism. Considering the fatty acids as crucial compound in the infantile nutrition, they have been supplemented in infant formula to substitute maternal milk. For quantifying the long chain polyunsaturated fatty acids requires a fat extraction process in mild conditions, due to the occurrence of reactive sites in their molecules. In the present work the analytical methods for determining the polyunsaturated fatty acid and lipids in infantile formula were compared. For these purposes, a sample of infantile formula from the National Institute of Standards and Technology was analyzed, following methodologies described in the “*Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*” and the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). The polyunsaturated fatty acid contents were assessed by using distinct internal standards and correction factors for flame ionization detector. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found among the total lipids and polyunsaturated fatty acids results, in infantile formula analyzed on different lipid extraction methods. The lowest dispersions results (rsd %), of polyunsaturated fatty acid were observed by the AOAC methodology. According to these data, the use of fatty acid methyl ester 23:0 internal standard and of theoretical correction factors of flame ionization detector in relation to the internal standard itself were the most suitable for determining the polyunsaturated fatty acid.

**Key words.** polyunsaturated fatty acid, infantile formula, analytical methodology, gas chromatography, lipids.

## INTRODUÇÃO

A partir de meados dos anos de 1950 surgiu a ideia de alimentar crianças com o uso de fórmulas infantis desde o nascimento<sup>1</sup>. Nos últimos anos houve uma notável melhoria nas fórmulas infantis. Atualmente há várias opções e estão sendo suplementadas para se tornarem parecidas com a composição do leite materno humano<sup>2</sup>.

Os lipídios nas fórmulas infantis são compostos por diferentes fontes de gordura, podendo ser de origem animal (gordura láctea), vegetal (óleo de canola, óleo de milho, óleo de coco, óleo de palma) e ácidos graxos polinsaturados microencapsulados<sup>3</sup>. Na gordura láctea há predomínio de ácidos graxos saturados e no leite humano há uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados quando comparado com o leite de vaca. Havendo diferenças nas proporções de ácidos graxos saturados e insaturados nestas fontes de lipídicas, torna-se importante a análise do perfil de ácidos graxos nestes alimentos, pois quanto maior for o tamanho da cadeia e mais saturada, menor sua absorção no organismo<sup>4</sup>.

O ácido linoleico (18:2  $\omega$ -6) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3  $\omega$ -3) são ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados endogenamente pelos seres humanos e alguns animais. Além disso, são precursores das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, originando os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, entre eles o ácido araquidônico (20:4  $\omega$ -6) e o ácido docosahexaenoico (22:6  $\omega$ -3)<sup>2</sup>. O recém-nascido, entretanto, tem um limite na capacidade de produção de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, em particular quando a dieta é pobre em seus precursores<sup>5</sup>. Dessa maneira, há a necessidade da suplementação desses ácidos graxos nas fórmulas infantis<sup>2</sup>.

Ácidos graxos polinsaturados atuam em diversos processos fisiológicos e metabólicos, e são importantes na nutrição infantil pelo seu rápido aumento no cérebro durante o primeiro ano de vida<sup>6,7</sup>. O ácido araquidônico é importante precursor da “série 2” dos eicosanoides, que são importantes biomedadores. Os ácidos graxos araquidônico e docosahexaenoico são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células e são os ácidos graxos polinsaturados predominantes no sistema nervoso central. O ácido docosahexaenoico é o ácido graxo mais abundante na membrana foto receptora da retina<sup>2</sup>.

Estudo realizado por Straarup et al. (2006)<sup>8</sup>, na Dinamarca, demonstrou que apenas quatro das 28 fórmulas infantis analisadas encontravam-se com níveis

superiores de ácido  $\alpha$ -linolênico preconizado pela legislação daquele país. Em um pequeno número, especialmente aquelas para necessidades especiais, encontrou-se alto conteúdo de ácido linoleico e para a razão de ácido linoleico/ácido  $\alpha$ -linolênico obtiveram-se valores entre 17:1 e 55:1. Recentes estudos indicam que a formação do ácido docosahexaenoico é inibida pela alta disponibilidade do ácido linoleico. A razão de ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico e a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em algumas formulas infantis comercializadas na Dinamarca demonstrou que houve uma melhora no perfil dos ácidos graxos, entretanto o conteúdo de  $\alpha$ -linolênico ainda é baixo e o de ácido linoleico é alto comparado com a recomendação e com o leite das dinamarquesas. Somente algumas das fórmulas infantis estudadas continham ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa.

As recomendações de organismos internacionais e de legislações locais para fórmula infantil baseiam-se na composição do leite materno humano<sup>9</sup>. A legislação brasileira, Portaria nº 977 (1998)<sup>10</sup>, preconiza valores para gordura total e ácido linoleico, entre outros macro e micronutrientes. A Norma *Codex Alimentarius* stan 72-1981<sup>11</sup>, depois de uma revisão realizada em 2007, aceitou as recomendações de um grupo da The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN)<sup>9</sup>, o qual recomenda valores além dos lipídios totais e ácido linoleico, para ácido  $\alpha$ -linolênico, razão de ácido linoleico/ $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico, ácido docosahexaenoico, ácidos graxos *trans*, soma dos ácidos mirístico e palmítico e ácido erúico.

A quantificação dos lipídios nos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos (éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio e metanol) e determinação gravimétrica. A habilidade de recuperar os vários componentes dos lipídios varia com o solvente de extração. Solventes mais polares como clorofórmio/metanol extraem lipídios polares, incluindo fosfolipídios, esteróis, terpenos, graxas, hidrocarbonetos e materiais não lipídicos<sup>12</sup>. Matrizes alimentares ainda podem ser previamente tratadas, com hidrólise em meio básico para solubilizar proteínas, adição de ácido para quebrar emulsão ou hidrolizar lipídios de matrizes complexas<sup>12,13</sup>. No caso das fórmulas infantis a quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, devido à presença de vários sítios reativos na molécula (insaturações), deve envolver processos de extração da gordura em condições amenas, pois, podem

ocorrer reações de degradação e/ou isomerização nas insaturações dos ácidos graxos polinsaturados, podendo gerar resultados discrepantes na quantificação destes ácidos graxos<sup>12</sup>.

Estudos de comparação de metodologias para ácidos graxos polinsaturados são muito importantes e de difícil execução, pois são realizadas diversas etapas e em cada uma delas há parâmetros que influenciam na quantificação final dos ácidos graxos. Além disso, gera subsídios para padronização de metodologia nos diversos laboratórios, fato este relevante, pois, os alimentos estão sendo suplementados com estes ácidos graxos, e sua correta quantificação torna-se necessária para uma clara informação ao consumidor.

O objetivo desse estudo foi comparar os métodos de extração de lipídios e quantificação (fatores de resposta do detector de ionização de chama e padrões interno) dos ácidos graxos polinsaturados: ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenoico em amostra de referência de fórmula infantil da National Institute of Standard and Technological (NIST 1849/2006).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Para o estudo foi utilizada uma amostra de fórmula infantil da NIST 1849/2006, que tem indicados os teores de ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenoico. A amostra foi armazenada em freezer. As análises foram realizadas entre os anos de 2006 a 2008.

### ■ Reagentes e padrões

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: metanol, clorofórmio, éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Foram utilizados dois padrões cromatográficos de triacilgliceróis 11:0 e 13:0 e de éster metílico de ácido graxo 13:0, 21:0 e 23:0, marca Sigma com alta pureza.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a

24:0, marca Supelco; uma de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoleico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3), marca Sigma; e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, marca Sigma, sendo: elaídico (18:1 9*t*); vacênico (18:1 11*c*); *trans* vacênico (18:1 11*t*); (18:1 7*c*); (18:1 12*c*); CLA (18:2 9*c*, 11*t* e 18:2 10*t*, 12*c*); palmitoelaídico (16:1 9*t*), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9*t*, 12*t*); EPA (20:5 5*c*, 8*c*, 11*c*, 14*c*, 17*c*); araquidônico (20:4 5*c*, 8*c*, 11*c*, 14*c*); docosahexaenoico (20:6 4*c*, 7*c*, 10*c*, 13*c*, 16*c*, 19*c*).

## Métodos

### ■ Determinação de lipídios totais

A determinação de lipídios totais foi realizada de acordo com os métodos gravimétricos descritos por Bligh e Dyer<sup>14</sup>; AOAC 963.15<sup>15</sup> (hidrólise ácida) e Roese Gottlieb<sup>16</sup> (AOAC 989.05) e método de cálculo pela somatória de ácidos graxos como triacilgliceróis de acordo com a AOAC 996.06<sup>16</sup> (hidrólise ácida).

### ■ Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Três metodologias foram comparadas para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos: Hartman e Lago<sup>17</sup>, modificado por Maia e Rodrigues-Amaya<sup>18</sup> (catálise mista, básica e ácida), o qual possui reagentes menos tóxicos que o método oficial do AOAC, que utiliza trifluoreto de boro; IUPAC<sup>19</sup> (meio básico, KOH), sendo que este método utiliza reagentes simples e é de rápida execução; *in situ*<sup>20</sup> (básico, com metóxido de sódio), metodologia amplamente estudada por realizar em uma única etapa a extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

### ■ Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

Os ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama, da marca Shimadzu e modelo 17A, com coluna capilar de sílica fundida com fase 100% bis-cianopropil polisiloxana (SP 2560) de 100m, 0,25mm de diâmetro e 0,20 $\mu$ m de espessura de filme. A otimização das condições cromatográficas foi realizada em estudo prévio, descrito por Aued-Pimentel<sup>21</sup>. Foram empregadas as seguintes condições: temperatura do injetor e detector: 250°C; fluxo – 1,90 mL/min; rampa de temperatura: 45 °C (1 min); 13 °C/min até 175 °C; 4 °C/min até 215 °C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175

kPa; razão de divisão da amostra 1:15.

#### ■ Quantificação dos ácidos graxos

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada pela adição de padrão interno à gordura extraída das fórmulas infantis. Os padrões utilizados foram os ésteres metílicos de ácidos graxos 13:0, 21:0, 23:0; e os cálculos foram realizados de acordo com a equação 1<sup>15</sup> e expressos em g/100 g de amostra:

$$conc_{AG_i} = \frac{M_{PI} \cdot A_{AG_i} \cdot K'_{AG_i} \cdot f_{AG_i} \cdot L}{m \cdot A_{PI}} \quad (1)$$

Onde:

$M_{PI}$  = massa do padrão interno adicionada à amostra;

$A_{AG_i}$  = área do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra;

$K'_{AG_i}$  = fator de correção de resposta de cada éster metílico de ácido graxos no detector de ionização em chama com relação ao 16:0, 18:0 ou 23:0;

$f_{AG_i}$  = fator de conversão de éster metílico de ácido graxos para ácido graxo<sup>15</sup>;

$L$  = teor de lipídios em gramas por cem gramas de amostra;

$m$  = massa da amostra em gramas;

$A_{PI}$  = área do padrão interno do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra.

No método de determinação da gordura por cálculo adicionou-se o triacilglicerol 13:0 e ésteres metílicos de ácidos graxos 21:0 e 23:0 no começo da extração, os ácidos graxos foram calculados de acordo com as equações 2 e 3<sup>16</sup>, e a gordura total a partir da soma dos componentes em forma de triacilglicerol, de acordo com a equação 4<sup>16</sup>.

$$M_{EMAG_i} = \frac{A_{AG_i} \cdot m_{PI} \cdot 1,0059 \cdot K'_{AG_i}}{A_{AGPI}} \quad (2)$$

Onde:

$M_{EMAG_i}$  = massa de cada componente de éster metílico de ácido graxo;

$A_{AG_i}$  = área do pico de cada componente;

$m_{PI}$  = massa do padrão interno;

1,0059 = fator de conversão do padrão interno de triacilglicerol em éster metílico de ácido graxo correspondente;

$K'_{AG_i}$  = fator de resposta experimental do detector de ionização em chama, em relação ao padrão interno;

$A_{AGPI}$  = área do pico do padrão interno.

$$M_{AG_i} = M_{EMAG_i} \cdot f_{AG_i} \quad (3)$$

$$M_{TAG_i} = M_{EMAG_i} \cdot f_{TAG_i} \quad (4)$$

$M_{AG_i}$  = massa de cada componente expressa como ácido graxo correspondente;

$f_{AG_i}$  = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo em ácido graxo<sup>16</sup>.

$M_{TAG_i}$  = massa de cada componente expressa como triacilglicerol correspondente ;

$f_{TAG_i}$  = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo em triacilglicerol<sup>16</sup>.

Para a quantificação dos ácidos utilizaram-se fatores de resposta do detector de ionização de chama teóricos em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0, calculados de acordo com as equações 5 e 6<sup>22,23</sup>.

$$K_{AG_i} = \frac{M_{AG_i}}{(n_{AG_i} - 1) \cdot A_c} \quad (5)$$

$K_{AG_i}$  = fator de correção da resposta para o ácido graxo "i".

$M_{AG_i}$  = massa molecular do éster metílico de ácido graxo "i".

$n_{AG_i}$  = número de átomos de carbono do éster metílico do ácido graxo "i".

$A_c$  = massa atômica do carbono (12,01).

$$K' = \frac{K_{AG_i}}{K_{PI}} \quad (6)$$

$K'_{AG_i}$  = fator relativo de correção, para o éster metílico de ácido graxo "i".

$K_{PI}$  = fator de resposta do detector de ionização em chama em relação ao 16:0, 18:0 ou 23:0.

$K_{AG_i}$  = fator de resposta do detector de ionização em chama para o ácido graxo "i".



### Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para a comparação dos procedimentos foi aplicado teste de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Foram calculados os coeficientes de variação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios obtidos para a comparação das variáveis para a quantificação dos ácidos graxos foram realizados em etapas distintas e independentes. No caso da extração de lipídios as análises foram feitas quando a amostra chegou ao laboratório, nos anos de 2006 e 2007, e as demais comparações, durante o decorrer do estudo, sendo o último estudo da metodologia *in situ* e conseqüentemente a comparação dos métodos de metilação, nos anos de 2007 e 2008.

### ■ Determinação dos lipídios ou gordura total

A Tabela 1 apresenta os valores de lipídios para a amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração, entretanto esta amostra não apresentava valor indicativo para lipídios.

Os métodos de extração de lipídios revelaram diferenças estatísticas entre eles. Pelo método gravimétrico por hidrólise ácida obteve-se o maior teor de lipídios. Os métodos de Bligh e Dyer e o de Roese Gottlieb não apresentaram diferença estatisticamente entre eles, bem como os métodos de Roese Gottlieb e AOAC 996.06. O tratamento ácido prévio pode extrair componentes não lipídicos da amostra, como glicerol, carboidratos de baixo peso molecular, aminoácidos e sais de ureia, superestimando assim os valores<sup>12</sup>. O método por cálculo, de acordo com a AOAC 996.06, demonstrou resultados

comparáveis aos demais métodos. Este método considera como lipídios totais a soma dos ácidos graxos de todas as fontes lipídicas, expressos como triacilgliceróis, entretanto necessita de um maior número de padrões de éster metílico de ácido graxo para identificação dos picos cromatográficos.

O método oficial para determinação de lipídios totais para fórmula infantil segundo a AOAC é o de Roese Gottlieb. Esse método revelou valores próximos ao descrito por Bligh e Dyer, o qual apresentou o menor teor de lipídios. Pelo método de Bligh e Dyer a relação metanol, clorofórmio e água é crítica na etapa de extração<sup>12</sup>. No método de Roese Gottlieb é feito um tratamento prévio com álcalis para solubilizar a proteína e facilitar a quebra da emulsão, em seguida ocorre a extração utilizando éter etílico e éter de petróleo<sup>12</sup>. O teor de lipídio encontrado pelo método de Roese Gottlieb pode estar relacionado com o tempo de contato da amostra com os solventes, a quantidade de amostra, e a capacidade destes solventes extraírem mono, di e triacilglicerol e apenas alguns lipídios polares<sup>12,14</sup>.

O método mais apropriado para a determinação de lipídios em fórmula infantil é o método do Roese Gottlieb, pois utiliza condições experimentais brandas não comprometendo as insaturações dos ácidos graxos polinsaturados, extrai apenas os componentes lipídicos dos alimentos, não superestimando seus valores, além de ser o método oficial da AOAC para este produto e o recomendado pelo *Codex Alimentarius*. Entretanto, os resultados indicaram uma menor recuperação da gordura pelo método oficial. Novas tecnologias têm sido empregadas, como o microencapsulamento dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, para suplementação das fórmulas e são apresentadas propostas de validação de métodos para a determinação

**Tabela 1.** Valores de lipídios para amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração de lipídios

Métodos	Lipídios (g/100g)	
	Média $\pm$ Desvio padrão	CV (%)
HA (AOAC 963.15)	31,53 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	0,92
HA (AOAC 996.06)	28,20 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	1,78
Roese Gottlieb	26,71 $\pm$ 0,36 <sup>b,c</sup>	1,34
Bligh Dyer	25,15 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	0,95

Análise realizada em triplicata; HA: hidrólise ácida, CV(%): coeficiente de variação em porcentagem; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

de lipídios e ácidos graxos, que utilizam tanto hidrólise ácida como enzimática para digerir as microcápsulas e extrair adequadamente os lipídios e ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa das fórmulas infantis<sup>3</sup>.

#### ■ Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

Os resultados da comparação entre os três métodos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos encontram-se na Tabela 2. Para a comparação das metodologias de Hartman e Lago modificada por Maia e Rodrigues-Amaya e IUPAC, a determinação da gordura foi normalizada, isto é, extraída de acordo com Roesse Gottlieb. O padrão interno empregado para o cálculo foi o éster metílico de ácido graxo 23:0. No caso do método *in situ* não há etapa de extração de gordura.

Os três métodos revelaram resultados equivalentes, apenas houve diferenças estatísticas para o ácido  $\alpha$ -linolênico. No método descrito pela IUPAC observaram-se os maiores valores, incluindo os desvios padrão, mais altos que os obtidos pela metodologia de Hartman e Lago modificada por Maia e Rodrigues-Amaya<sup>17,18</sup>.

A metodologia da IUPAC que utiliza como catalisador o KOH metanólico apesar de não ser recomendada para produtos alimentícios devido à ocorrência de hidrólise e formação de ácido graxo livre<sup>24</sup>, é rápida e tem fornecido resultados adequados para alguns produtos alimentícios<sup>25</sup>. No presente trabalho, para a fórmula infantil, as limitações acima descritas podem ter gerado desvios-padrão mais altos do que o observado pelo método de Hartman e Lago modificado. Quanto ao método *in situ* este apresentou resultados comparáveis

com o método de Hartman e Lago modificado por Maia e Rodrigues-Amaya. Entretanto mais estudos devem ser realizados, para otimizar esta metodologia, pois, há a influência de variáveis experimentais como a quantidade de água da amostra, acidez, tomada de amostra, entre outros, no desempenho do método<sup>20</sup>.

#### ■ Determinação dos ácidos graxos polinsaturados

Na Tabela 3 estão presentes os valores de ácidos graxos para os diferentes métodos de extração de lipídios, bem como para os diferentes padrões internos (PI) utilizados. O método AOAC 963.15 foi o que apresentou os teores mais próximos dos valores indicativos, principalmente quando se utiliza os PIs 21:0 e 23:0, fato este explicado pelo maior teor de lipídios. Entretanto, os valores de desvios padrão foram os maiores quando comparado aos outros métodos. Este procedimento utiliza tratamento ácido e a quente, podendo afetar as duplas ligações das moléculas de ácido graxo polinsaturado de cadeia longa e conseqüentemente resultar em maiores dispersões nos resultados<sup>12</sup>. Entretanto, pode auxiliar na extração dos lipídios e ácidos graxos no caso de produtos microencapsulados<sup>3</sup>.

Os métodos de Bligh e Dyer e Roesse Gottlieb são os que mais preservam as ligações características dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, pois utilizam tratamentos brandos. O método por cálculo mostrou resultados satisfatórios quando comparado aos valores indicativos e/ou outros métodos para o ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico, quando o cálculo foi com PI 13:0, porém houve uma perda do ácido araquidônico e do ácido docosahexaenoico. O tempo de aquecimento do método (40 min) pode ter desencadeado reações

**Tabela 2.** Comparação dos teores de AG obtidos por diferentes métodos de preparação para ésteres metílicos de ácidos graxos na amostra de referência de fórmula infantil da NIST

	Roese Gottlieb PI EMAG 23:0		Método "in situ"
	Hartman e Lago	IUPAC	Golay et al.
LA (g/100g)	5,98 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
ALA (g/100g)	0,53 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,540 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>
ARA (g/100g)	0,096 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,100 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,097 ± 0,003 <sup>a</sup>
DHA (g/100g)	0,0224 ± 0,0003 <sup>a</sup>	0,024 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,021 ± 0,002 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão (triplicata); LA: ácido linolênico; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; ARA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenoico; PI: padrão interno; EMAG: éster metílico de ácido graxo; médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

**Tabela 3.** Valores de ácidos graxos de acordo com os diferentes métodos de extração de lipídios, metilação dos ácidos graxos por Hartman e Lago modificado, e diferentes padrões internos utilizados na quantificação de ácidos linoléico,  $\alpha$ -linolênico, araquidônico e docosahexaenóico na amostra de referência da NIST 1849

	Bligh e Dyer (1959)		Roese Gottlieb (1972)		Hidrólise ácida AOAC 963.15 (2005)		Hidrólise ácida AOAC 996.06 (2005)	
	Média $\pm$ Dp	CV (%)	Média $\pm$ Dp	CV (%)	Média $\pm$ Dp	CV (%)	Média $\pm$ Dp	CV (%)
Referência								
	5,87							
Ácido linoleico (g/100g)	5,39 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	2,33	5,84 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,42	6,37 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	2,26	6,02 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	2,26
	4,70 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,12	4,88 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,85	6,00 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	1,05	6,73 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	1,05
	4,94 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,42	5,09 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,71	6,18 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,92	7,01 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	0,92
Referência								
	0,601							
Ácido $\alpha$ -linolênico (g/100g)	0,53 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	3,12	0,61 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,72	0,67 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,57	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,57
	0,48 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,06	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,71	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,14	0,65 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,14
	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,94	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,88	0,61 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,57	0,68 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,57
Referência								
	0,21							
Ácido araquidônico (g/100g)	0,135 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	4,53	0,193 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>	3,93	0,177 $\pm$ 0,006 <sup>b,c</sup>	3,21	0,166 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	3,21
	0,150 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	1,39	0,158 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	1,65	0,195 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	3,89	0,173 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	3,89
	0,165 $\pm$ 0,005 <sup>j</sup>	2,74	0,177 $\pm$ 0,004 <sup>j,k</sup>	1,96	0,216 $\pm$ 0,009	4,19	0,189 $\pm$ 0,003 <sup>k</sup>	4,19
Referência								
	0,07							
Ácido docosahexaenóico (g/100g)	0,034 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	5,02	0,049 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,39	0,056 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	2,45	0,034 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	2,45
	0,046 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	7,7	0,051 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,12	0,064 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	2,51	0,045 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	2,51
	0,057 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	7,59	0,058 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	1,2	0,070 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	2,99	0,053 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	2,99

Análise realizada em triplicata; Dp: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, na mesma linha, de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



de degradação e/ou isomerização desses ácidos graxos, diminuindo sua quantificação.

A escolha do padrão interno é de grande importância para a quantificação dos ácidos graxos. O padrão interno deve eluir numa região próxima dos ácidos graxos de interesse, ser estável e não co-eluir com outros ácidos graxos<sup>26</sup>. No presente trabalho verificou-se que o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 13:0 eluiu muito antes dos ácidos graxos polinsaturados e também superestimou os valores de ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico; o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 21:0, nas condições cromatográficas descritas, pode co-eluir com o ácido linoleico conjugado (CLA), normalmente presente em gorduras lácteas. Portanto, o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0 revelou ser o mais apropriado para a quantificação de ácidos graxos polinsaturados, pois possui os requisitos citados, ou seja, elui numa região próxima dos ácidos graxos de interesse, não co-elui com outros ácidos graxos, é estável, além de apresentar resultados adequados quanto à precisão e exatidão para quantificação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em alimentos<sup>26,27</sup>.

Os fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama foram estudados em relação ao 16:0, 18:0 e 23:0, e os resultados encontram-se na Tabela 4. Para o estudo da influência desses fatores na quantificação dos ácidos graxos, normalizaram-se o método de extração de gordura utilizando Roesse Gottlieb, metilação por Hartman e Lago modificado e cálculo com padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0.

Houve apenas diferença estatisticamente significativa no uso de diferentes fatores de correção teóricos para o detector de ionização em chama para a quantificação de ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico. Os

valores em relação ao 16:0 e 18:0 foram menores que o da referência, sendo o fator de correção teórico do detector de ionização em chama em relação 23:0 o mais próximo dos valores da referência. Shreiner (2005)<sup>26</sup> demonstrou que a utilização de fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama são mais apropriados para quantificação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, e que podem ocorrer erros de quantificação do ácido docosahexaenoico de até 22,6% em relação à escolha de fatores experimentais.

## CONCLUSÃO

O método de extração de lipídios revelou influenciar de maneira significativa na quantificação final dos lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados nas fórmulas infantis. As menores dispersões nos resultados dos ácidos graxos polinsaturados foram obtidas pela extração de gordura pelo método oficial, ou seja, Roesse Gottlieb, entretanto, houve menor recuperação da gordura por este método. Com relação às metodologias de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a de Hartman e Lago e a *in situ* apresentaram desempenho satisfatório. Quanto à quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil recomenda-se o uso de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação a esse padrão interno. Futuros trabalhos devem ser realizados para estabelecer métodos adequados de extração dos lipídios e esterificação direta (*in situ*) para quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis, tendo em vista as tecnologias de suplementação das fórmulas infantis e objetivando a melhoria de desempenho e diminuição do tempo de análise.

**Tabela 4.** Comparação dos teores dos ácidos graxos calculados com diferentes fatores teóricos de correção de resposta do DIC para amostra NIST 1849

	Referência	16:0	18:0	23:0
LA (g/100)	5,87	5,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>
ALA (g/100)	0,601	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>
ARA (g/100)	0,21	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
DHA (g/100)	0,07	0,068 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,070 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,072 ± 0,007 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão (triplicata); LA: ácido linoléico; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; ARA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenoico; médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Lipídios totais por hidrólise ácida AOAC 963.15, extração de lipídios por Roesse Gottlieb, metilação por Hartman e Lago e quantificação por padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Adolfo Lutz pela colaboração e parceria.

### REFERÊNCIAS

1. Koo WWS, M BBS, FACN. Efficacy and safety of docosahexaenoic acid and arachidonic acid addition to infant formulas: can one buy better vision and intelligence?. *J Am Coll Nutr* 2003; 22 (2): 101-7.
2. Carver JD. Advances in nutritional modifications of infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1550S-4S.
3. Curtis JM, Berrigan N, Dauphinee P. The determination of n-3 fatty acid levels in food products containing microencapsulated fish oil using the one-step extraction method. Part 1: measurement in the raw ingredient and dry powdered foods. *J Am Oli Chem Soc* 2008; 85: 297-305.
4. Hirayama KB, Sperião PGL, Fagundes-Neto U. Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. *The electronic J Ped Gastroent Nutr and Liver Disease* 2006, v. 10, n. 3, p. 1-10.
5. Schaafma G. The Western diet with a special focus on dairy products. *Institut Danome*, 1997; 4:29-43.
6. Auestad N, Scott DT, Janowsky JS, Jacobsen C, Carroll, RE, Montalto MB et al. Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics* 2003; 112(3): 177-83.
7. McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, a n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:281-95.
8. Straarup EM, Lauritzen L, Faerk J, Hoy CE, Michaelsen KF. The stereospecific triacylglycerol structures and fatty acid profiles of human milk and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 293-9.
9. Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Fagundes-Neto U, Gopalan S, Hernell O et al. Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41(5): 584-99.
10. Brasil. Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 29 dez. 1998. Seção 1, p 20-1.
11. Codex Alimentarius Commission. JOINT FAO/WHO. Food standards programme. Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981, revisado em 2007.
12. Carpenter DM, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid Analysis. In: Carpenter DE, Sullivan DM, editores. *Methods of analysis for nutritional labeling*. Arlington: AOAC International; 1993. p. 85-104.
13. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 2001; 36:1283-7.
14. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-7.
15. Métodos Analíticos Físicos-Químicos do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4.ed., Brasília: ANVISA, 2005.
16. *Official Methods of Analysis of AOAC*. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.
17. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac* 1973; 22: 475-6.
18. Maia EL, Rodrigues-Amaya DBR. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1993; 53(1/2): 27-35.
19. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Standard Methods for Analyses of Oils, Fats and Derivatives*. Report of IUPAC Working Group WG 2/87, Method 2.301. 7.ed. Blackwell Scientific Publications, 1987.
20. Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destaillets, F. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry* 2006, 101: 1115-21.
21. Aued-Pimentel S. Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios [Tese de doutorado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007. 230 pp.
22. Ackman RG, Sipos JC. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. *J AOCS* 1964; 41: 377-8.
23. Bannon CD, Grasse JD, Hillker AE. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability: Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. *J AOCS* 1986; 63: 105-10.
24. Christie WW. Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in lipid methodology – two*. 1993; p.69-111. [Acesso em: 05 out.2004]. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>.
25. Aued-Pimentel S, Caruso MSE, Kumagai EE, Ruvieri V, Zenebon O. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64(2):167-72.
26. Schreiner M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. Evaluation of factors affecting accuracy. *J Chrom A* 2005; 1095: 126-30.
27. Mazalli MR, Bragagnolo N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. *Lipids* 2007; 42: 483-90.

# Valor nutritivo de peixes da costa marítima de Alagoas, Brasil

## Nutritive values of fishes from maritime coast of Alagoas, Brazil

RIALA6/1185

Maria Emília da Silva MENEZES<sup>1\*</sup>, Giselda Macema LIRA<sup>2</sup>, Cristhiane Maria Bazílio de OMENA<sup>1</sup>, Johnnatan Duarte de FREITAS<sup>1</sup>, Antônio Euzébio Goulart SANT'ANA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus Universitário, CEP 57072-970, Maceió, AL, Brasil, e-mail: memenezes\_2@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brasil.

Recebido: 20.02.2009 – Aceito para publicação: 03.04.2009

### RESUMO

Foram investigados o perfil de ácidos graxos, a composição centesimal, o valor calórico e o teor de colesterol em duas espécies de peixes marinhos do Estado de Alagoas: carapeba-listrada (*Eugerres plumieri* Cuvier, 1830) e a cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829), analisando-se 20 amostras de cada espécie. Elevado teor de umidade foi observado na amostra de carapeba-listrada, assim como os maiores valores de proteínas e cinzas, em base úmida, foram detectados nesta citada espécie. Quanto aos lipídeos, os valores obtidos para as duas espécies foram iguais, em base úmida. As amostras de cavala apresentaram o maior valor calórico, bem como o teor de colesterol mais elevado em base úmida. No perfil de ácidos graxos, a cavala apresentou percentuais mais elevados de monoinsaturado oleico (7,74%) e de poli-insaturados: linoleico (6,91%),  $\alpha$ -linolênico (2,90%), EPA (10,82%), e DHA (4,50%). A relação poli-insaturados/saturados foi mais elevada na cavala (0,95), bem como o somatório dos teores de EPA + DHA (15,32). Na avaliação da qualidade nutricional dos lipídeos, as espécies estudadas mostraram os índices de n-6/n-3, hipocolesterolêmicos / hipercolesterolêmicos (HH), índice de aterogenicidade (IA) e índice de trombogenicidade (IT) favoráveis para o consumo alimentar. Considerando-se os resultados obtidos, a espécie cavala pode ser considerada boa fonte de ácidos graxos, principalmente o ácido ômega-3 e pelo seu valor em HH.

**Palavras-chave.** peixes, composição centesimal, valor calórico, colesterol, ácidos graxos.

### ABSTRACT

The fatty acids profile, the proximate composition, the calorie and cholesterol contents were investigated in two species of sea fishes from the State of Alagoas, Brazil: carapeba-listrada (*Eugerres plumieri* Cuvier, 1830) and cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829). Twenty samples of each fish species were analyzed. High moisture contents were found in carapeba-listrada samples. The highest values of protein and ash were detected in cavala on the wet basis. The both two fish species presented the same lipid values on the wet basis. The highest calorific value was observed in cavala samples, and also on the wet basis the highest cholesterol contents was found in this fish specie samples. Regarding to the fatty acids profile, cavala showed the highest percentage of monounsaturated oleic (7.74%) and polyunsaturated: linoleic (6.91%),  $\alpha$ -linolenic (2.90%), EPA (10.82%), and DHA (4.50%). The polyunsaturated/saturated ratio was highest in cavala (0.95), and also in the sum total of EPA + DHA contents (15.32). In assessing the nutritional quality of lipids, the analyzed fish species showed the rates of n-6/n-3, hypocholesterolemic/hypercholesterolemic (HH), index of atherogenicity (IA), and index of thrombogenicity (IT) as favorable for consumption. Considering these results, cavala can be considered a remarkable source of fatty acids, mainly of omega-3 acid, and because of its HH value.

**Key words.** fishes, proximate composition, caloric value, cholesterol, fatty acids.

## INTRODUÇÃO

Os ácidos n-3 e n-6 são precursores dos ácidos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos) e são essencialmente fornecidos pela dieta, uma vez que não são sintetizados pelo organismo humano. O ácido linoleico (n-6) origina o ácido araquidônico, que é o precursor de eicosanoides tromboxanos e a prostaciclina (I<sub>2</sub>), respectivamente promotor e inibidor da agregação plaquetária<sup>1</sup>.

O ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (n-3), precursor dos ácidos eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) e docosahexaenoico (22:6n-3, DHA), os quais além da função no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, fotorecepção e sistema reprodutivo<sup>2</sup> são apontados como redutores de risco de doenças coronarianas, hipertensão moderada, incidência de diabetes e prevenção de certas arritmias cardíacas e morte súbita. Dados experimentais e epidemiológicos mostram uma redução significativa no índice de mortalidade por doenças coronarianas, confirmando a atividade cardioprotetoras dos ácidos graxos EPA e DHA<sup>3</sup>.

Os peixes são fontes ricas de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente os da série n-3, como EPA. No que diz respeito ao tipo e teor de ácidos graxos presentes nos peixes, as diferenças são influenciadas pelas características genéticas, habitat, qualidade e quantidade de alimentos disponíveis (fitoplâncton e zooplâncton)<sup>4</sup>. A constatação epidemiológica de que o consumo de peixes é capaz de reduzir riscos de doenças coronarianas torna a carne de pescado um alimento importante, não apenas como alternativa alimentar de alto valor nutritivo, mas ainda de consumo de um alimento funcional<sup>1</sup>.

Da costa marítima alagoana (Brasil) depende a sobrevivência de muitos pescadores. Os pratos à base de peixe e marisco não somente fazem parte da dieta da população litorânea como também são muito apreciados pelos turistas. Segundo o boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Nordeste do Brasil<sup>5</sup>, a carapeba-listrada (*Eugerres plumieri* Cuvier, 1830) e a cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829) são os peixes mais abundantes da costa alagoana.

Tendo em vista a importância alimentar e a carência de informações sobre o valor nutritivo desses peixes regionais, procedeu-se o estudo do perfil de ácidos graxos, composição centesimal, valor calórico e teor de colesterol em filés destas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram analisadas 40 amostras de filés de peixes in natura de duas espécies de peixes mais comercializadas da Costa Marítima/AL, segundo IBAMA5 sendo: 20 amostras de carapeba-listrada (*Eugerres plumieri* Cuvier, 1830) e 20 amostras de cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829). Foram escolhidos peixes de aproximadamente 500g procedentes da Costa Marítima/AL e coletados nos seguintes períodos: a carapeba-listrada em agosto de 2004 e a cavala em outubro de 2004.

As amostras pesando aproximadamente 250g de filé, sem pele e sem espinha, foram trituradas em processador até a formação de massa homogênea. Assim preparadas, foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno, identificadas e congeladas a -17°C até o momento da realização das análises. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, onde as análises foram realizadas.

### ■ Determinação da composição centesimal

Após homogeneização, realizaram-se as seguintes determinações em triplicata: Umidade: determinada pela perda de peso em estufa regulada a 105°C, segundo AOAC<sup>6</sup>. Cinzas: obtidas por incineração de uma quantidade conhecida da amostra, em mufla a 550°C, até obtenção de peso constante AOAC<sup>6</sup>. Proteínas: determinadas pelo método Kjeldhal, que consiste na determinação do nitrogênio total. Para converter o resultado em proteína bruta foi utilizado o fator 6,257 AOAC<sup>6</sup>. Lipídeos totais: extraídos a frio pelo método de Folch et al.<sup>7</sup> utilizando 2 extrações com clorofórmio:metanol (2:1), lavagem do resíduo (clorofórmio:metanol – 2:1), adição de KCl 0,88% em H<sub>2</sub>O, separação das fases, adição de metanol: H<sub>2</sub>O (1:1), evaporação de clorofórmio em rota-evaporador, fração lipídica ressuspendida em clorofórmio. Alíquotas foram tomadas para determinações gravimétricas. Os carboidratos (fração Nifext) foram determinados por diferença. O valor calórico total foi calculado a partir dos coeficientes calóricos correspondentes para proteínas e lipídeos, respectivamente, 4 e 9kcal/g<sup>8</sup>.

### ■ Colesterol

O teor de colesterol foi determinado através de colorimetria conforme a adaptação<sup>9</sup>. Uma alíquota de 5mL do



extrato clorofórmio foi tomada para análise, através de saponificação, extração da matéria insaponificável, reação de cor, leitura da absorvância em espectrofotômetro a 490nm, contra um branco. As absorvâncias obtidas foram comparadas às da curva padrão utilizada<sup>10</sup>.

#### ■ Perfil de ácidos graxos

Os lipídeos totais foram esterificados segundo Hartman e Lago<sup>11</sup>. Os ésteres metílicos foram analisados no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas utilizando-se um cromatógrafo modelo GC-17 A (Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com detector de ionização de chama, injetor split na razão de 1:50 e coluna capilar D-1 (30m; 0,25mm; 0,25µm). O espectrômetro de massas utilizado foi Shimadzu com energia do feixe eletrônico de 70eV.

As condições cromatográficas foram as seguintes: gás de arraste – hélio com fluxo de 1mL/min; a temperatura inicial da coluna foi 150°C por 5 minutos, com aquecimento até 240°C a uma taxa de 2°C/min; a temperatura do injetor foi de 220°C e a do detector de 245°C. As amostras foram injetadas manualmente em triplicata e o volume de injeção foi de 1µL. O tempo de análise cromatográfica foi de 70 minutos. Para a identificação dos ácidos graxos foram utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos puros, comparando-se o tempo de retenção dos ésteres metílicos das amostras e dos padrões. A quantificação dos ácidos graxos foi feita por normalização de área.

#### ■ Índice de qualidade nutricional dos lipídeos

A qualidade nutricional da fração lipídica foi avaliada por três índices a partir dos dados de composição em ácidos graxos, através dos seguintes cálculos: Índice de Aterogenicidade (IA) =  $[(12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0)] / (\sum \text{AGMI} + \sum n-6 + \sum n-3)$ ; Índice de Trombogenicidade (IT) =  $(14:0 + 16:0 + 18:0) / [(0,5 \times \sum \text{AGMI}) + (0,5 \times \sum n-6 + (3 \times \sum n-3) + (\sum n-3 / \sum n-6))]$ , segundo Ulbricht e Southgate<sup>12</sup>; e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) =  $(18:1\text{cis}9 + 18:2\text{n}-6 + 20\text{n}-6 + 18:3\text{n}-3 + 20:5\text{n}-3 + 22:5\text{n}-3 + 22:6\text{n}-3) / (14:0 + 16:0)$ , segundo Santos-Silva et al.<sup>13</sup>. Em que: AGMI = todos os ácidos monoinsaturados.

#### ■ Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Epi-info, versão 2002. Para testar a homogeneidade da variância foi aplicada a análise de variância (ANOVA), sendo que para variâncias não homogêneas foram aplicados o teste  $\chi^2$  de Barlett e o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi  $p = 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, encontram-se os dados relativos à composição centesimal dos filés de peixes carapeba-listrada e cavala. A umidade foi o componente majoritário da porção comestível dos peixes estudados, conforme constatado também por Yeannes e Almandos<sup>14</sup> e Wang et al.<sup>15</sup>, a primeira espécie foi a que apresentou maior teor de umidade (79,18%). Percentuais inferiores aos encontrados nesta pesquisa foram verificados para a cavala por Pigott e Tucker<sup>16</sup> na porção comestível sem especificar a espécie estudada (67,2%). Luzia<sup>17</sup> obteve teores de umidade para a sardinha de 73,92% durante o verão e 72,05% no inverno e, para a corvina, 79,27% durante o verão e 77,80% no inverno, estando esses valores dentro da faixa referida para espécies marinhas.

Com relação às proteínas, a cavala foi maior que o da carapeba-listrada em base úmida, quantidade essa análoga à da carapeba-listrada (18,60%) e cavala (18,70%) descrito por Franco<sup>18</sup>. Vasconcelos<sup>19</sup> descreveu valores de 20,48% a 23,71% nas amostras de cavala (*Scomberomus regalis*) durante seis meses de pesquisa. Deslypere<sup>16,20</sup> descreveram valores referentes a cavala de 23,00% e 19,00%, respectivamente. Segundo Kirk e Sawyer<sup>21</sup>, quando o método de Kjeldahl é empregado, a composição centesimal total pode ultrapassar os 100%, devido à multiplicação do nitrogênio por 6,25, o que foi observado por Belda e Pourchet-Campo<sup>22</sup> e corroborado no presente trabalho.

Os teores de lipídeos encontrados, em base úmida, para ambas as espécies foram iguais a 2,5%. Segundo Penfield e Campbell<sup>23</sup>, os peixes podem ser classificados quanto ao teor de gordura em magros (abaixo de 5% de gordura) ou gordos (acima de 5% de gordura). Bruschi<sup>24</sup> observou em filés teores de lipídeos mais elevados para a sardinha (*Sardinella brasiliensis*; 7,7%), para o atum (*Katsuwonus pelamis*; 6,84%), para a pescada foguete (*Macrodon ancylodon*; 4,0%) e para a goete (5,0%); contudo, foram detectados teores mais baixos que os

**Tabela 1.** Composição centesimal, valor calórico e teor de colesterol dos peixes da costa marítima de Alagoas

Composição	Carapeba-listrada ( <i>Eugerres plumieri</i> )		Cavala ( <i>Scomberomorus cavalla</i> )	
	Base úmida*	Base seca**	Base úmida*	Base seca**
Umidade (g/100g)	79,18 ± 2,43	-	76,52 ± 1,77	-
Proteínas (g/100g)	20,86 ± 1,61	101,63 <sup>a</sup> ± 14,93	23,67 ± 2,86	98,48 <sup>b</sup> ± 10,89
Lipídeos (g/100g)	2,5 ± 0	12,20 <sup>a</sup> ± 1,78	2,5 ± 0	10,79 <sup>b</sup> ± 0,97
Cinzas (g/100g)	1,13 ± 0,16	5,48 <sup>a</sup> ± 0,85	1,26 ± 0,13	5,33 <sup>a</sup> ± 0,55
Calorias (kcal/100g)	105,97	-	116,51	-
<b>Colesterol (mg/100g)</b>	<b>159,32 ± 4,01</b>	<b>781,60<sup>a</sup> ± 11,79</b>	<b>175,23 ± 3,89</b>	<b>750,68<sup>b</sup> ± 13,02</b>

\* Média ± desvio padrão de 20 amostras analisadas em triplicata. \*\* Médias obtidas através de cálculos. Numa mesma linha, os valores que apresentarem letras minúsculas sobrescritas distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

obtidos nesta pesquisa para a pescada branca (*Cynoscion gatucupa*; 1,0%), para a corvina (*Micropogonias furnieri*; 1,0%) e para a enchova (2,0%). Armstrong et al.<sup>25</sup>, observaram que peixes de águas tropicais possuem teores inferiores de lipídeos quando comparados aos de regiões frias. Assim, pode-se afirmar que a carapeba-listrada e a cavala apresentaram resultados em concordância com a literatura.

No que diz respeito às cinzas, a cavala apresentou o maior percentual (1,26%), em base úmida, havendo similaridade estatística ( $p < 0,05$ ) em base seca para as duas espécies. As amostras estiveram dentro da faixa de 1,0% a 2,0% referidas na literatura<sup>24,26</sup>. Luzia<sup>17</sup> detectou que todas as espécies de seu estudo apresentaram valores de cinzas entre 1,0% e 2,0%.

O maior valor calórico foi encontrado na cavala (116,51kcal) e o menor na carapeba-listrada (105,97kcal); em nenhuma das duas espécies foi detectada a presença de carboidratos.

Esses resultados permitiram classificar as espécies estudadas na categoria D (gordura < 5,0%; proteína > 20,0%)<sup>4</sup>. Portanto, sob o ponto de vista nutricional, o valor dessas espécies é excepcional, visto que podem ser utilizados na elaboração de dietas para pacientes obesos, diabéticos e que apresentem doenças crônicas, como câncer e problemas cardiovasculares. Além de serem eficazes cardioprotetores, têm apresentado bons resultados no tratamento de pessoas com distúrbios depressivos e psíquicos.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das concentrações de colesterol detectados no presente estudo. O menor teor em base úmida foi detectado na

carapeba-listrada (159,32mg/100g). Franco<sup>18</sup> relata valor de colesterol na espécie cavala similar a este estudo (170mg/100g).

Na Tabela de Composição de Alimentos da Unicamp<sup>27</sup> para teores de colesterol, observa-se em atum 48,0mg/100g, bacalhau 139,0mg/100g, corvina de água salgada 167,0mg/100g, merluza 57,0mg/100g, pescada 65,0mg/100g e sardinha 61,0mg/100g.

Embora os filés dos peixes do habitat marinho sejam mais ricos em colesterol que os demais, eles ainda estão abaixo do limite máximo recomendado<sup>28</sup>, que sugere uma ingestão de colesterol total menor que 300mg diárias.

A Tabela 2 apresenta a porcentagem dos ácidos graxos. Quanto aos ácidos graxos saturados, o ácido palmítico foi o que apresentou maior concentração em ambas as espécies analisadas, 16,75% para a carapeba-listrada e 17,34% para a cavala. Os elevados percentuais de ácido palmítico encontrados neste trabalho também foram detectados por Badolato et al.<sup>29</sup> em filés e polpas de peixes marinhos analisados nas diferentes estações do ano, variando de 14,2% a 31,3% nos filés e 15,5% a 29,1% na polpa. Bruschi<sup>24</sup> detectou valores superiores a 20,0% para o ácido palmítico em todas as espécies de peixes estudadas, com o maior teor 29,6% na sardinha e o menor teor 16,23% na pescada foguete.

A concentração do ácido esteárico foi maior na cavala (10,45%), o que se constitui num aspecto positivo sob o ponto de vista nutricional. Valores maiores que os encontrados neste trabalho foram relatados por Luzia<sup>17</sup> para as seguintes espécies de peixes: sardinha, analisada no verão (46,82%) e no inverno (48,12%); corvina, no verão

**Tabela 2.** Porcentagem dos ácidos graxos presentes nos peixes procedentes de habitat marinho (Costa Marítima - AL)

<b>Tipo de ácido graxo</b>	<b>Carapeba-listrada (<i>Eugerres plumieri</i>) %</b>	<b>Cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>) %</b>
<b>A. Saturados</b>		
Láurico (12:0)	4,02 ± 1,58 <sup>b</sup>	2,44 ± 1,94 <sup>a</sup>
Mirístico (14:0)	3,45 ± 0,62 <sup>b</sup>	1,55 ± 0,75 <sup>a</sup>
Pentadecanóico (15:0)	13,78 ± 4,93 <sup>b</sup>	9,28 ± 1,16 <sup>a</sup>
Palmítico (16:0)	16,75 ± 5,97 <sup>b</sup>	17,34 ± 7,02 <sup>a</sup>
Margárico (17:0)	7,05 ± 1,04 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,51 <sup>a</sup>
Esteárico (18:0)	8,87 ± 1,66 <sup>b</sup>	10,45 ± 1,01 <sup>a</sup>
Total	53,92	42,65
<b>B. Monoinsaturados</b>		
Palmitoleico (16:1)	3,91 ± 0,83 <sup>b</sup>	2,90 (± 0,59) <sup>a</sup>
Heptadecenoico (17:1 n-7)	8,06 ± 1,13 <sup>b</sup>	5,79 ± 1,37 <sup>a</sup>
Oleico (18:1 n-9)	7,70 ± 2,25 <sup>a</sup>	7,74 ± 1,27 <sup>a</sup>
Total	19,67	16,43
<b>C. Poli-insaturados</b>		
Linoleico (18:2 n-6)	6,72 ± 1,60 <sup>a</sup>	6,91 ± 1,18 <sup>a</sup>
α-Linolênico (18:3 n-3)	5,43 ± 1,40 <sup>b</sup>	2,90 ± 0,92 <sup>a</sup>
Araquidônico (20:4 n-6)	3,12 ± 0,90 <sup>b</sup>	5,38 ± 1,60 <sup>a</sup>
Eicosapentaenóico – EPA (20:5 n-3)	3,19 ± 0,74 <sup>b</sup>	10,82 ± 3,14 <sup>a</sup>
Docosapentaenóico (22:5 n-3)	3,35 ± 0,36 <sup>b</sup>	10,38 ± 1,37 <sup>a</sup>
Docosahexaenóico – DHA (22:6 n-3)	2,90 ± 0,80 <sup>b</sup>	4,50 ± 1,87 <sup>a</sup>
Total	24,71	40,89
<b>D. Relações</b>		
Razão Insaturados/Saturados	0,82	1,34
Razão Monoinsaturados/Saturados	0,36	0,38
Proporção n-6:n-3	01:01.5	1:02
Somatório EPA + DHA	6,09	15,32
Razão Hipercoeristêmicos/Hipocoeristêmicos**	0,38	0,32

\* Média de 10 amostras analisadas em duplicata. \*\* A razão Hipercoeristêmicos/Hipocoeristêmicos foi calculada dividindo-se o somatório dos ácidos 14:0 e 16:0 (hipercoeristêmicos) pelo somatório dos ácidos monoinsaturados e poli-insaturados (hipocoeristêmicos). Numa mesma linha, os valores com letras minúsculas sobrescritas distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

38,61% e no inverno 38,2%, e tilápia 35,47% durante o verão e 36,39% no inverno. Já para o curimatá os teores foram menores, no verão 27,84% e no inverno 30,02%.

Os ácidos saturados láurico e mirístico foram detectados em pequenas concentrações em ambas as espécies estudadas. Porém, vale salientar que a cavala apresentou os menores percentuais destes ácidos graxos 2,44% e 1,55 %, respectivamente, demonstrando um fator positivo desta espécie pois, tal ácido graxo promove hipercolesterolemia<sup>30</sup>. Nova et al.<sup>30</sup> estudando o pargo (*Lutjanus purpureus*) encontraram para o ácido mirístico 3,25%, percentual similar ao encontrado nesta pesquisa para a carapeba-listrada (3,45%), porém superior ao da cavala.

O ácido pentadecanoico que apareceu em segundo lugar em concentração em ambas as espécies, foi detectado em quantidades de 13,78 % e 9,28% para a carapeba-listrada e a cavala, respectivamente.

Entre os ácidos graxos monoinsaturados, os ácidos heptadecenoico, oleico e palmitoleico foram os detectados nas espécies estudadas. O ácido heptadecenoico apresentou maior porcentagem na carapeba-listrada, 8,06% e o ácido oleico na cavala 7,74%.

O ácido graxo oleico é utilizado no organismo como fonte preferencial de energia metabolizável no crescimento rápido<sup>31</sup>. Teores inferiores foram citados por Bruschi<sup>24</sup> para as espécies: sardinha (6,59%), sardinha com músculo roxo (6,95%), pescada foguete (5,75%), pescada branca (8,28%), corvina (0,94%), bonito-listrado (3,46%), bonito com músculo roxo (2,68%) e teor similar ao deste trabalho para goete (7,75%).

Quanto aos poli-insaturados, estes valores representaram 24,71% para a carapeba-listrada e 40,89% para a cavala, do total de ácidos graxos presentes nas amostras, evidenciando uma vantagem da cavala em relação à carapeba-listrada. Teores menores foram detectados por Luzia<sup>17</sup> e Bruschi<sup>24</sup>, para todas as espécies estudadas.

Os níveis de ácido  $\alpha$ -linolênico detectados em ambos os peixes estudados foram mais elevados que os encontrados por Romero et al.<sup>32</sup> em conservas de pescados no Chile. Badolato et al.<sup>29</sup> encontraram em polpas de peixes marinhos valores, variando de 0,9% a 2,5%. Teores menores também foram detectados por Bruschi<sup>24</sup> em todas as espécies estudadas. O ácido  $\alpha$ -linolênico é importante na modulação do metabolismo do ácido araquidônico, com consequente redução da agregação plaquetária<sup>32</sup>.

Foi detectado o ácido araquidônico em ambas as espécies estudadas, especialmente na cavala (5,38%), reforçando as verificações feitas em outros trabalhos de

que peixes de águas tropicais contêm maiores níveis de ácidos graxos insaturados da série n-6, principalmente o ácido araquidônico, do que os de águas temperadas<sup>33</sup>. Este ácido graxo é considerado essencial, tendo papel central no processo inflamatório, uma vez que pode ser convertido em eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas e lipoxinas) que são importantes em uma série de sistemas fisiológicos, como o renal, gastrointestinal, reprodutor e cardiovascular, além de serem mediadores das respostas imune e inflamatória<sup>31</sup>.

Com relação aos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA, a cavala apresentou níveis elevados para ambos, 10,82% para o EPA e 4,50% para o DHA em comparação à carapeba-listrada. Para Luzia<sup>17</sup>, em relação aos poli-insaturados, os principais ácidos graxos encontrados na sardinha, em ambas as estações pesquisadas, foram o DHA (10,06% e 11,43% para o verão e inverno, respectivamente), seguido do EPA (3,02% e 1,87% para o verão e inverno, respectivamente). Bruschi<sup>24</sup> detectou teor expressivo de DHA para todas as espécies estudadas, sendo superiores aos observados neste trabalho (13,4% a 21,4%), enquanto para o EPA o teor de 10,9% encontrado para a corvina foi similar ao obtido neste trabalho para a espécie cavala (10,82%).

O somatório de EPA e DHA encontrado para as espécies do habitat marinho foi de 15,32% e 6,09% para a cavala e carapeba-listrada, respectivamente, observando-se mais um fator positivo da espécie cavala sobre a carapeba-listrada. Luzia<sup>17</sup> encontrou para a sardinha 13,09% no verão e 13,22% no inverno. Valores maiores foram relatados por Badolato et al.<sup>29</sup> para todas as espécies analisadas.

Com relação à razão entre os ácidos graxos das famílias n-6 e n-3, a Japan Society of Lipid Nutrition recomenda que seja de 4:1 para adultos saudáveis e de 2:1 na prevenção de doenças crônicas em idosos<sup>34</sup>. No presente trabalho, a proporção foi de 1:2 para cavala e 1:1,5 para a carapeba-listrada. Para Luzia<sup>17</sup> essa relação variou significativamente entre as estações do ano em sardinha, sendo encontrado no verão 2,3:1 e no inverno 3,2:1. Entretanto, Hearn et al.<sup>35</sup> detectaram, para a mesma espécie estudada por Luzia<sup>17</sup>, o valor de 3,7:1.

A qualidade nutricional do perfil lipídico avaliada por diferentes índices encontra-se descrita na Tabela 3. Alimentos que apresentam a razão de ácidos graxos poli-insaturados e saturados (P/S) abaixo de 0,45 têm sido considerados como indesejáveis à dieta pelo Department of Health and Social Security<sup>36</sup> por sua potencialidade na



**Tabela 3.** Índices de qualidade nutricional da fração lipídica dos peixes procedentes de habitat marinho (Costa Marítima - AL)

	P/S	n-6/n-3	HH	IA	IT
Carapeba-listrada ( <i>Eugerres plumieri</i> )	0,46	0,66	1,6	0,78	0,48
Cavala ( <i>Scomberomorus cavalla</i> )	0,96	0,43	2,57	0,45	0,29

P/S = Poliinsaturados/Saturados; n-6/n-3 =  $\Sigma$  da série Ômega6/  $\Sigma$  a série Ômega 3; HH =  $\Sigma$  hipocolesterolêmicos/  $\Sigma$  hipercolesterolêmicos; IA = índice de aterogenicidade e IT = índice de trombogenicidade<sup>12</sup>.

indução do aumento de colesterol sanguíneo. Nos peixes estudados esta razão variou de 0,46 na carapeba-listrada e 0,96 na cavala. Ramos et al.<sup>1</sup> observaram valores que variaram de 0,13 para o pacu, 0,44 para o cachara, 0,49 para o dourado até 0,52 no pintado. No entanto, o índice P/S avaliado isoladamente tem recebido restrições, uma vez que não considera os efeitos metabólicos dos ácidos graxos monoinsaturados<sup>37</sup>.

Considerando a razão n-6/n-3, valores abaixo de 4,0 sugerem quantidades desejáveis à dieta para a prevenção de riscos cardiovasculares<sup>36</sup>. A relação n-6/n-3 encontrado neste estudo variou 0,43 na cavala e 0,66 na carapeba-listrada, resultados que promovem as espécies estudadas à categoria de potencialmente saudáveis. A razão n-6/n-3 observada no presente estudo é inferior a de outras espécies de água doce relatadas por Moreira et al.<sup>38</sup> variação de 1,14 a 8,79. Valores superiores também foram descritos por Ramos et al.<sup>1</sup> (0,95; 1,14; 1,18; 3,65) respectivamente para o pintado, dourado, cachara e o pacu, todas as espécies da região pantaneira.

O cálculo da razão  $\Sigma$  ácidos graxos hipocolesterolêmicos/  $\Sigma$  ácidos graxos hipercolesterolêmicos, índice (HH) relacionado mais especificamente com o metabolismo do colesterol, resultou em valores na faixa de 1,6 para carapeba -listrada e 2,57 para a cavala. Testi et al.<sup>39</sup> encontraram valores entre 2,03 a 2,46 pra peixes de água doce ou salgada. Valores altos para essa relação são desejáveis sob o ponto vista nutricional<sup>1</sup>.

O índice de aterogenicidade (IA), que relaciona os ácidos pró e antiaterogênicos na carapeba-listra e na cavala foram respectivamente 0,78 e 0,45. Valores semelhantes foram descritos por Ramos et al.<sup>1</sup> para quatro espécies de água doce variando de 0,49 no pintado e 0,86 para o pacu. Senso et al.<sup>40</sup> observaram valores na faixa de 0,21 a 0,29

para o peixe marinho *Sparus aurata* cultivado e estocado sob congelamento. Em contraste à relação HH, valores mais baixos para IA são desejáveis.

Dentre as considerações para avaliação da qualidade dietética de alimentos é incluída a razão n-6/n-3 menor que 10<sup>1</sup>. As duas espécies possuem conteúdo recomendado para a razão n-6/n-3.

## CONCLUSÃO

A cavala foi a espécie que apresentou teores mais elevados de proteínas, ácidos graxos saturados (esteárico), ácidos graxos monoinsaturados (oleico e palmitoleico) e ácidos graxos poli-insaturados. Dentre estes, destacam-se os ácidos de grande importância nutricional, como o EPA e o DHA e o da família n-6 (linoleico). Na avaliação da qualidade nutricional dos lipídeos, as espécies estudadas mostraram os índices de n-6/n-3, HH, IA e IT favoráveis quanto ao consumo alimentar destacando a cavala pelo seu valor em HH. As informações obtidas neste estudo podem ser úteis para os consumidores e para nutricionistas que trabalham com o planejamento de alimentação para indivíduos ou grupos.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao (PIBIC/CNPq/UFAL) pela bolsa concedida a uma das autoras. Nossos agradecimentos se estendem aos professores José Madalena Silva e Paulo Vanderlei Ferreira pelo auxílio com as análises estatísticas.

## REFERÊNCIAS

- Ramos Filho MM, Ramos MIL, Hiane PA, Souza EMT. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 2008; 28(2): 361-5
- Celik M, Diler A, Kuçukgulmez A. A comparison of the proximate compositions and fatty acid profiles of zander (*Sander lucioperca*) from two different regions and climatic conditions. *Food Chemistry*, Champaign.2005; 92(4):637-41
- Sperandio LM. A Importância do Peixe na Alimentação Humana. GO. Disponível em <<http://www.setorpesqueiro.com.br/portal.asp>>
- Stansby ME. Polyunsaturates and fat in fish flesh. *J. Am. Diet. Ass.* 1973; 63: 625-30.
- Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil 2000. (IBAMA, 2001). Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste - 2001 - Tamandaré, PE: CEPENE.
- AOAC – Association of official analytical chemists. HORWITZ, Washington. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 17 ed. Arlington: AOAC Inc., 2000; (1/2).
- Folch J, Lees, M, Sloanne Stanley, GH. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497-509.
- Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria nº33 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília - DF, 30 mar. 1998. Seção I, nº 60-E, p. 5-6.* Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para as vitaminas, minerais e proteínas.
- Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Teores de Colesterol em Carne Suína e Bovina e Efeito do Cozimento. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas.1995; 15 (1):11-7.
- Searcy RL, Bergquist LM. A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. *Clin. Chimica Acta.*, Amsterdam. 1960; 5: 192-9.
- Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Lab Pract.*1973; 22: 475-7.
- Ulbricht TLV, Southgate DAT. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, London. 1991; 338 (8773): 985-92.
- Santos-Silva J, Bessa RJB, Santos-Silva F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, Roma. 2002; 77 (2/3): 187-94.
- Yeannes MI, Almandos ME. Estimati on of fish proximate composition starting from water content. *J. Food Compos. Anal.*, San Diego. 2003; 16: 81-92.
- Wang Y. Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture Res.*, Oxford.2005; 36:1408-13.
- Pigott GM, Tucker BW. *Seafood: effects of technology on nutrition*. New York: Marcel Dekker; 1990. cap. 7, p.176-205.
- Luzia LA et al. The Influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of brazilian fish. *Food Chem.* 2003; 15:1-5.
- Franco, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9. edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. 307p.
- Vasconcelos MMM. Efeito do cozimento e preparo de pratos regionais sobre o teor de colesterol em crustáceos, moluscos e peixes do Estado do Ceará [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza, Ceará. Universidade Federal do Ceará - Tecnologia de Alimentos.1995. 86p.
- Deslypere JP. Effects of fish consumption compared to intake of fish oil: In: Somogyi, JC.; Hotzel, D. (Ed)-*Marine Foods*. Belgium: Basel & Karger; 1990. 46, p. 53-69.
- Kirk RS, Sawyer R. *Pearson's composition and analysis of foods*. 9th, ed. Harlow Essex, Longman; 1981; 504-18.
- Belda MCR, Pourchet-Campo MAA. Ácidos graxos essenciais em nutrição: Uma visão atualizada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1991; 11(1): 5-35.
- Penfield MP, Campbell AM. *Experimental Food Science*. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1990.
- Bruschi FLF. *Rendimento, composição centesimal e perfil de ácidos graxos de pescados e seus resíduos monografia [Graduação em Oceanografia]*. Itajaí, Santa Catarina. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí. 2001. 134p.
- Armstrong SG. Nutritional evaluation of lipids in fish from temperate Australian waters. *J. Food Sci.* 1991; 56 (4): 1111-2.
- Morais C. Rendimento cárneo e composição química da ictiofauna acompanhante na captura do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri* HELLER, 1862). *Colet. ITAL*.1992; 22 (1): 6-72.
- NEPA - Tabela de Composição de Alimentos - TACO - UNICAMP. 2004. Material disponível em [hptt: www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco) . Acesso em 17/07/2005.
- IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq. Bras. Cardiol.*2004; 82 (Suppl IV).
- Badolato ESG. Composição centesimal, de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*.1994; 54 (1): 27-35.
- Nova CMVMV, Godoy HT, Aldrigue ML. Composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVII, Fortaleza, 2000, 4: 45.
- Lira GM, Mancini Filho J, Torres RP, Oliveira AC, Vasconcelos AMA, Omena CMB, Almeida MCS. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1): 31-8.
- Romero N.P. et al. Composicion en ácidos grasos y aporte de colesterol de conservas de jurel, sardinha, salmon y atún al natural. *Arch. Latino Am. Nutr.*1996; 46: 7-77.
- Sinclair AJ. Dietary fat and cardiovascular disease: the significance of recent developments for the food industry. *Food Australian*. 1993; 42; 226-31.
- Uauy R, Valenzuela A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, New York. 2000; 16 (7/8): 680-4.
- Hearn TL. Polyunsaturated fatty acids and in fish flesh for selecting species for health benefits. *J. Food Sci.*1987; 52(5): 1203-08.
- Department of Health and Social Security. *Diet and cardiovascular disease. Report on Health and Social Subjects*, London:HMSO,1984.
- Williams CM. Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, Paris, 2000; 49 (3): 165-80.
- Moreira AB et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of three brazilian Brycon freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, London, 2001; 14 (6): 565-74.
- Test S et al. Nutritional traits of dorsal and ventral filets from three farmed fish species. *Food Chemistry*, Champaign. 2006; 98(1): 104-11.
- Senso I et al. On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*. Champaign. 2007; 101 (1): 298-307.

# Influência do tipo de filtro no teor de cafeína de bebidas de café

## Effect of filter type on the caffeine contents in the coffee beverages

RIALA6/1186

Silvana Mariana SREBERNICH<sup>1\*</sup>, Eduardo VICENTE<sup>2</sup>, Sandra FRANCESCHINI<sup>1</sup>, Ana Laura MINATEL<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Faculdade de Nutrição, PUC-Campinas, Av. John Boyd Dunlop s/nº, Jardim Ipaussurama, CEP 13059-740, Campinas, SP, Brasil, e-mail: srebernich@uol.com.br

<sup>1</sup>Faculdade de Nutrição, Centro de Ciências da Vida, PUC - Campinas, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Química, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, ITAL, Campinas, SP, Brasil.

Recebido: 21.01.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

A cafeína é um alcaloide pertencente à classe das metilxantinas. É a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo encontrada em diversos tipos de alimentos entre os quais a bebida do café. Em virtude do alto consumo de café pela população brasileira e pelo fato da cafeína estar associada tanto a aspectos positivos como negativos para a saúde, torna-se relevante determinar a quantidade desse alcaloide na bebida do café. Neste estudo avaliou-se a influência do tipo de filtro utilizado na preparação de bebida do café quanto ao teor de cafeína após a filtração. Os filtrados da bebida, obtidos após terem sido coados através de cinco diferentes tipos de filtro, foram analisados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os teores de cafeína encontrados variaram de  $58,01 \pm 0,59$  a  $80,38 \pm 1,25$ mg/100mL, de acordo com os diferentes tipos de filtro empregados. Houve variação na capacidade de retenção de cafeína pelo filtro, conforme o tipo de material utilizado na produção do filtro, e obedeceu a seguinte ordem: tecido de flanela > papel ecológico = tecido de algodão > papel comum > tecido de nylon. Em suma, a escolha do tipo de filtro utilizado na extração da bebida mostrou ser importante, pois com uma mesma quantidade de bebida ingerida é passível de se consumir diferentes quantidades de cafeína.

**Palavras-chave.** café, cafeína, tipo de filtro.

### ABSTRACT

Caffeine is an alkaloid compound belonging to the class of methylxanthines. It is the mostly worldwide consumed psychoactive substance. It can be found in several kinds of food including in coffee beverage. Due to the highly consumption of coffee drink by the Brazilian population, and on account of the fact of the caffeine has been associated with both positive and negative aspects to the health, determining the contents of this alkaloid in coffee beverage is relevant. In the present study the effect of the filter type on the caffeine contents contained in coffee beverage was evaluated. After filtering the coffee beverages through five different types of filter, the respective filtrates were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The rates of caffeine ranged from  $58.01 \pm 0.59$  to  $80.38 \pm 1.25$ mg/100mL, depending on the each analyzed types of filter. The caffeine-retention capacity presented by the filter was correlated with the type of material used for manufacturing of the filter, which was in the following order: flannel tissue > ecological paper = cotton tissue > normal regular paper > nylon tissue. Hence, choice of the type of the filter used for filtrating coffee drink showed to be very important, considering that even drinking the same quantity of coffee beverage it seems likely consuming different amounts of caffeine, depending on the filter type the coffee drink was filtrated through.

**Key words.** coffee, caffeine, type of filter.

## INTRODUÇÃO

A cafeína é um alcaloide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das metilxantinas<sup>1,2</sup>. Ela está presente em diversos tipos de alimentos, como chocolates, refrigerantes, chás, bebidas energéticas e no café, considerado a principal fonte desta substância. Este composto também é encontrado em diversos medicamentos<sup>3,4</sup>.

O consumo mundial de cafeína é estimado em mais de 120.000 toneladas por ano<sup>3</sup>. É considerada a substância psicoativa mais usada no mundo e cerca de 80% da população geral faz uso desta diariamente<sup>5</sup>. Por esse motivo o café e a cafeína vêm sendo o assunto de diversos estudos que visam averiguar os efeitos adversos e o potencial de abuso desde o século XIX. Os resultados destes estudos, no entanto, são contraditórios. Acredita-se hoje que a ingestão de cafeína possa causar tanto efeitos negativos como positivos, que dependem de cada organismo, da eventual existência de patologias (considerando que certas patologias podem ser agravadas pela presença da cafeína), da dose ingerida e da frequência de ingestão<sup>4,6,7</sup>.

As estimativas das doses ingeridas de cafeína requerem o conhecimento de suas quantidades nas diferentes fontes (alimentos, medicamentos etc.), o que torna difícil quantificar o seu consumo. Além disso pode haver variabilidade no teor de cafeína das matérias-primas utilizadas. Por exemplo, no caso do grão de café a quantidade de cafeína será dependente de fatores tais como: espécie genética (arábica ou robusta), métodos de cultivo, condições climáticas etc., o que pode variar de ano para ano até numa mesma propriedade agrícola<sup>3</sup>.

Na bebida, além da quantidade de pó, influenciam também o tipo de produto (torrado ou instantâneo, descafeinado ou regular, em pó ou solúvel) e o processo utilizado no seu preparo, podendo ser coado, fervido, expresso, entre outros. Assim, uma xícara de 180mL de café pode conter de 20mg a 150mg de cafeína dependendo dos fatores relacionados acima<sup>8</sup>.

Por outro lado, devido ao alto consumo de café no Brasil e no mundo e de sua importância como fonte de cafeína na dieta e, também, por não existirem dados disponíveis na literatura referentes ao teor de cafeína em função do tipo de filtro utilizado na extração da bebida de café, este estudo teve por objetivo verificar a influência do tipo de filtro no teor de cafeína da bebida.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram adquiridos 4 quilos de pó de café (pacotes de 500 gramas, todos do mesmo lote e com a mesma data de validade) da marca de maior consumo na cidade de Campinas/SP, segundo informação levantada junto aos encarregados de setor em cinco lojas de hipermercados da cidade por meio do preenchimento de uma ficha onde indicavam as três marcas mais vendidas na loja onde trabalhavam. Visando ter uma amostra única, os conteúdos dos pacotes foram transferidos para um recipiente em que foram misturados, homogeneizados, transferidos para saco plástico, que foi vedado e armazenado à temperatura ambiente. Também foram adquiridos cinco tipos de filtro para posterior uso no preparo da bebida sendo três deles de tecido (nylon, algodão e flanela) e dois de papel (comum e ecológico).

### Métodos

#### ■ Preparo da bebida

O preparo da bebida foi realizado conforme metodologia descrita por Camargo e Toledo<sup>3</sup> em que 20,0g de pó de café foram transferidas para o filtro sobre o qual foram adicionados 250g de água previamente aquecida a temperatura de 92°C. A água foi utilizada em peso e não em volume com o objetivo de se evitar qualquer erro de medida. Realizaram-se três repetições para cada bebida obedecendo a um intervalo de 15 dias entre as repetições.

#### ■ Determinação do teor de cafeína na bebida

Na bebida obtida foi determinado o teor de cafeína por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de acordo com a metodologia descrita por Alves e Bragagnolo<sup>9</sup>, a qual se baseia na extração dos alcaloides em meio aquoso. Para as análises foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu modelo 10Avp, Japão) com detector de arranjo de diodos (Shimadzu SPD-10Avp, Japão) ajustado a 273nm. As condições cromatográficas foram: válvula de injeção tipo Rheodyne® com loop de 20µL, coluna Inertsil ODS-3 (150x4,6mm, 5µm) (Chrompack), com a temperatura da coluna de 30°C, fase móvel de ácido acético 1% e acetonitrila (90:10, v/v) na vazão de 1mL/min.

As amostras das bebidas de café preparadas foram diluídas com fase móvel e filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45µm antes da injeção.

A identificação dos picos foi feita pela comparação com os tempos de retenção obtidos nos padrões injetados, por co-cromatografia e comparação dos respectivos espectros de absorvância. A quantificação da cafeína foi feita por padronização externa, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  estimativa de desvio padrão calculada a partir de, no mínimo, duas repetições analíticas aleatórias e independentes. O coeficiente de variação (CV) foi calculado e comparado com o coeficiente de variação máximo aceitável para a concentração do analito, conforme descrito por Horwitz<sup>10</sup>. A linearidade de resposta do detector foi avaliada através da curva de calibração e do seu coeficiente de correlação.

#### ■ Avaliação estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey de comparação de médias ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) empregando-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*)<sup>11</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por se tratar de método preciso, simples e rápido a cromatografia líquida vem sendo utilizada por vários pesquisadores<sup>3, 4, 9, 12-15</sup> para determinar o teor de cafeína em diversos tipos de alimentos, daí a razão da sua utilização no presente trabalho. O método utilizado para a quantificação das amostras apresentou linearidade ( $r^2 > 0,98$ ) e os coeficientes de variação ficaram abaixo do valor máximo estabelecido pela equação de Horwitz<sup>10</sup>.

Segundo Nogueira e Trugo<sup>15</sup> a composição do café varia dependendo das condições do processamento, das espécies e variedades utilizadas nas misturas de cada fabricante sendo que a quantidade de cafeína pode ser diferente mesmo utilizando-se pó do mesmo fabricante. Com relação às espécies, o café Robusta apresenta maiores teores de cafeína e ácidos clorogênicos e menores de trigonelina do que o café Arábica. Sendo assim, a participação de cada uma dessas espécies utilizadas pelo fabricante e as condições do processo serão determinantes da composição final do café. A diferença nos teores de cafeína nas diferentes espécies de café foi citada em estudo realizado por Alves, Dias e Benassi<sup>13</sup> que observaram valores de 1,35 a 2,25g.100g<sup>-1</sup>, para café Arábica e Conilon, respectivamente.

No presente estudo todas as variáveis consideradas acima foram eliminadas visto que foi utilizado pó de café da mesma marca, do mesmo lote e com a mesma data de validade e o método para o preparo da bebida seguiu um procedimento padrão<sup>3</sup>. Assim, a única variável neste estudo foi o tipo de filtro utilizado na filtração da bebida. Na Tabela 1 encontram-se os resultados referentes aos teores de cafeína determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) nas bebidas de café obtidas por meio de filtração nos diferentes tipos de filtros.

Analisando-se os dados da Tabela 1 observa-se que os valores obtidos estão relacionados com o tipo de material (papel ou tecido), provavelmente devido às diferenças de porosidade (gramatura do papel ou tipo de trama/malha do tecido) do filtro. O tipo de filtro utilizado na extração da bebida teve influência significativa no

**Tabela 1.** Teor de cafeína nas bebidas de café em função do tipo de filtro utilizado

Amostras		Cafeína	
Número	Tipo de filtro	(mg/100mL) Média $\pm$ DP	(mg/60mL) <sup>1</sup> "cafezinho" <sup>2</sup>
1	Papel comum	77,52 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>	46,51
2	Papel ecológico	71,01 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>	42,60
3	Tecido de nylon	80,38 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	48,22
4	Tecido de algodão	71,99 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	43,19
5	Tecido de flanela	58,01 $\pm$ 0,59 <sup>d</sup>	34,80
		d.m.s. (5%) = 1,93	

Média  $\pm$  DP = Média de três repetições analíticas  $\pm$  desvio padrão; d.m.s. (5%) = diferença mínima significativa relativa às médias ao nível de erro de 5%; letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> valor obtido por cálculo a partir de mg/100mL; <sup>2</sup> dose brasileira de café equivalente a 60mL.



teor de cafeína, inversamente proporcional à capacidade de retenção do filtro. Desse modo, a bebida obtida utilizando-se filtro de nylon foi a que apresentou maior teor de cafeína (80,38mg/100mL), seguida pelas bebidas obtidas nos filtros de papel comum (77,52mg/100mL), de algodão (71,99mg/100mL), de papel ecológico (71,01mg/100mL) e de flanela (58,01mg/100mL) ocorrendo uma diferença entre o valor máximo e mínimo igual a 22,37mg/100mL. Assim, o filtro de flanela (mais fechado) reteve mais obtendo-se uma bebida com menor teor de cafeína enquanto que o filtro de nylon (mais aberto) reteve menos, produzindo uma bebida com maior teor de cafeína. A adsorção dos componentes da bebida, principalmente da cafeína, na superfície dos diferentes materiais dos filtros pode ser a explicação para a diferença de concentração do alcaloide nas bebidas. A análise estatística evidenciou que as amostras 1, 3 e 5 diferiram entre si e também das amostras 2 e 4, as quais não diferiram ao nível de erro de 5% ( $p < 0,05$ ).

Portanto, o tipo de filtro utilizado influenciou no teor de cafeína da bebida pronta e as variações citadas acima provavelmente sejam decorrentes de algum tipo de interação entre filtro e cafeína nele retida, ou seja, filtros de diferentes materiais apresentam diferentes capacidades de retenção de cafeína na filtragem da bebida do café.

Na Tabela 1 a quantidade de cafeína encontrada também foi expressa em mg/60mL de bebida, isto porque o cafezinho brasileiro<sup>12</sup> corresponde a 60mL. Quando considerada a dose de café (60mL) os teores de cafeína encontrados variaram de 34,80 a 48,22mg, em função do tipo de filtro utilizado. Segundo estudo realizado por Camargo e Toledo<sup>12</sup>, independente do tipo de filtro utilizado para a extração do café, os teores de cafeína encontrados serão sempre menores do que os obtidos com café expresso (59,80mg/60mL) e com café instantâneo (44,11/60mL). O valor médio de cafeína encontrado no café expresso é maior porque a quantidade de pó utilizada no seu preparo é praticamente o dobro (8,6g), enquanto que no presente estudo foi utilizado 4,8g para a mesma quantidade de água (60mL). No caso do café instantâneo o autor não relatou a relação da quantidade de café para a quantidade de água.

No presente estudo o menor teor de cafeína (34,80mg/60mL) foi obtido na bebida proveniente da filtragem com filtro de tecido de flanela, portanto superior ao resultado obtido por Camargo e Toledo<sup>12</sup> em que o teor médio de cafeína encontrado no café filtrado foi

de 32,50mg/60mL. Não se sabe o tipo de filtro utilizado por aqueles autores<sup>12</sup>. Todavia, sabe-se que a relação da quantidade de pó para a quantidade de água foi a mesma utilizada neste estudo.

A média de cafeína nas bebidas de café obtidas utilizando-se os diferentes tipos de filtro foi de 43,06mg/60mL, superior em 32,49% e 6,64% aos resultados encontrados por Camargo e Toledo<sup>12</sup> para o café filtrado (32,50mg/60mL) e para o café preparado por meio da fervura do pó junto com a água antes da filtração (40,38mg/60mL), respectivamente. Estes autores<sup>12</sup> verificaram também que nos extratos de café obtidos a partir do pó fervido junto com a água durante dois minutos, a quantidade de cafeína extraída foi 19 a 30% superior à obtida do café das mesmas marcas não fervido, apenas coado. Estes resultados indicam que as pessoas que têm por hábito ferver o pó junto com a água estarão ingerindo mais cafeína para uma mesma quantidade de café consumido. Ainda neste estudo<sup>12</sup> foi observada uma grande variabilidade nos níveis de cafeína (valores entre 25,80 e 50,40mg/60mL) dos extratos de café obtidos a partir de pós de diferentes marcas. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo são decorrentes das características do pó de café utilizado nos testes, provavelmente proveniente de grãos de café com maiores teores de cafeína.

Devido ao alto consumo de café pela população brasileira e pelo fato da cafeína estar associada tanto a aspectos positivos como negativos para a saúde, a determinação da quantidade média deste alcaloide na bebida do café é importante para avaliar a contribuição de cada tipo de preparo como fonte de cafeína na dieta.

Como existem resultados contraditórios quanto à segurança do consumo de cafeína, recomenda-se que sua ingestão diária seja em doses moderadas de até 300mg/dia<sup>3</sup>. No entanto, dependendo da marca, do tipo e da forma de preparo do café, a ingestão diária pode ultrapassar as recomendações. O consumo de uma xícara da bebida (60mL) filtrada utilizando-se um filtro de nylon pode resultar em uma ingestão de até 48,22mg de cafeína, o que implica que o consumidor que tem o hábito de tomar mais de 8 xícaras de café por dia poderá estar potencialmente exposto aos efeitos adversos da cafeína, pois estará ingerindo cerca de 385,76mg/dia. Já no caso do consumidor que utiliza filtro de flanela, com o mesmo consumo diário de café estará ingerindo aproximadamente 278,40mg/dia (8 x 34,80mg/60mL), quantidade esta dentro do que se considera como uma ingestão segura.

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tipo de filtro utilizado na extração da bebida teve influência significativa no teor de cafeína. A capacidade de retenção de cafeína pelos filtros obedeceu a seguinte ordem: filtro de flanela > filtro de papel ecológico = filtro de pano algodão > filtro de papel comum > filtro de nylon. A diferença entre o teor máximo e o teor mínimo de cafeína foi de 22,37mg/100mL (filtro de nylon e filtro de flanela). A diferença de porosidade entre os materiais dos filtros pode ser a origem das diferenças observadas. Portanto, a escolha do tipo de filtro utilizado na extração da bebida mostrou ser importante, pois com uma mesma quantidade de bebida ingerida é passível de se consumir diferentes quantidades de cafeína. Assim, sugere-se que para controlar a ingestão de cafeína, a escolha do tipo de filtro assim como o volume de café ingerido sejam considerados.

## REFERÊNCIAS

1. Minatti E. Cafeína: a droga predileta. *Rev Eletr Depart Quím* 2007 maio [citado 2002]; 22(1). Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/exemplar22.html>
2. Tfouni SAV, Camargo MCR, Vitorino SHP, Menegário TF, Toledo MCF. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. *Rev Nutr* 2007; 20(1): 63-8.
3. Camargo MCR, Toledo MCF. Teor de cafeína em cafés brasileiros. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998; 18(4): 421-4.
4. De Maria CAB, Moreira RFA. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. *Quím Nova* 2007; 30(1): 586-92.
5. Clausson B, Granath F, Ekblom A, Lundgren S, Nordmark A, Signorello LB, Cnattingius S. Effect of caffeine exposure during pregnancy on birth weight and gestational age. *Am J Epidemiol* 2002; 155(5): 429-36.
6. James JE. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosom Med* 2004; 66(1): 63-71.
7. Smith A. Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(9): 1243-55.
8. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Rev Pharmacol* 2005; 51(1): 83-133.
9. Alves AB, Bragagnolo N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Ciênc Farmaceut* 2002; 38(2): 237-43.
10. Horwitz, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* 1982; 54(1): 67-76.
11. S.A.S. Institute. User's guide: statistics [computer program - CD-ROM]. Version 6.1.2. Cary (USA): North Carolina State University; 1996.
12. Camargo MCR, Toledo MCF. Chá mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. *Ciênc Tecnol Aliment* 2002; 22(1): 49-53.
13. Alves ST, Dias RCE, Benassi MT. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim Nova* 2006; 29(6): 1164-8.
14. Aquino FWB, Amorim AGN, Prata LF, Nascimento RF. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004; 24(1): 32-8.
15. Nogueira M, Trugo LC. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciênc Tecnol Aliment* 2003; 23(2): 296-9.

# Caracterização microbiológica, físico-química e sensorial de hambúrgueres de carne de avestruz (*Struthio camellus*), elaborados com substituto de gordura

Microbiological, physical chemical and sensory characterization of the ostrich (*Struthio camellus*) meat burgers manufactured with fat substitute

RIALA6/1187

Érica Menezes SALVINO<sup>1\*</sup>, João Andrade da SILVA<sup>2</sup>, Elciane da Silva NOBREGA<sup>1</sup>, José Carlos do NASCIMENTO<sup>1</sup>, Maria José de Carvalho COSTA<sup>3</sup>, Janeeyre Ferreira MACIEL<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: Rua: Antonio Rabelo Júnior, 70, Miramar, CEP 58032-090, João Pessoa, PB, Brasil, e-mail: ericamsal@ig.com.br

<sup>1</sup>Departamento Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

Recebido: 09.02.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade de uso do amido modificado, como substituto total ou parcial da gordura em formulações de hambúrgueres de carne de avestruz. Foram elaboradas quatro formulações, sendo F1: contendo 5% de gordura suína; F2: com 3% de gordura suína e 2% de amido modificado; F3: com 2% de amido modificado; e F4: com 3% de gordura vegetal e 2% de amido modificado, que após serem adicionadas aos hambúrgueres de carne de avestruz foram submetidas às análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. As amostras com adição de amido modificado (F2, F3 e F4) apresentaram teor reduzido de gordura, maior rendimento e maior capacidade de retenção de água. Essas formulações atenderam aos padrões microbiológicos estabelecidos pela ANVISA, sendo, portanto próprias ao consumo. A formulação constituída de 3% de gordura suína e 2% de amido modificado (F2) foi a que obteve total aceitação entre os provadores. Portanto, essa formulação (F2) pode ser considerada como aditivo de alimento que atende às necessidades nutricionais de proteínas com teor reduzido de gordura, além de apresentar boa aceitação sensorial.

**Palavras-chave.** amido modificado, carne de avestruz, teor reduzido de gordura.

## ABSTRACT

The present study evaluated the feasibility of the use of a modified starch as an total or partial alternative of fat contents into the formulations of ostrich meat hamburgers. Four formulations were prepared, being F1: with 5% of swine fat; F2: with 3% of swine fat and 2% of modified starch; F3: with 2% of modified starch; F4: containing 3% of vegetable fat and 2% of modified starch, which were added to the ostrich meat burgers, and analyzed on the physical chemical, microbiological and sensory characteristic. The modified starch (F2, F3 and F4) added to the products showed a reduced level of fat, highest yield and highest water retention capacity. And the formulations showed to be in compliance with the microbiological standards established by ANVISA, being suitable for consumption. Hence, the formulation containing 3% swine fat and 2% of modified starch (F2) was the just one that was mostly accepted by proving personnels. Thereby, the formulation F2 included into foods might be regarded as those presenting the protein nutritional requirements, containing reduced fat contents, besides a good sensory acceptance.

**Key words.** modified starch, ostrich meat, reduced fat contents.



## INTRODUÇÃO

A população brasileira, cada vez mais, tem modificado seus hábitos alimentares, sendo típicos dos países desenvolvidos, isto é, um maior consumo de alimentos industrializados (refrigerantes e embutidos).

Estas mudanças observadas no padrão alimentar repercutem na ingestão elevada de lipídeos e carboidratos simples, trazendo como consequência o aumento na prevalência da obesidade e outras doenças crônicas não transmissíveis. Entretanto, a relação entre dieta e saúde está cada vez mais evidente, o que vem ocasionando o aumento no número de consumidores preocupados e interessados em saber o que realmente está consumindo, dando preferência a alimentos mais saudáveis. Por essa razão, a produção de alimentos com baixos teores de gordura é interessante do ponto de vista da saúde do consumidor<sup>1</sup>.

A carne é um alimento versátil, e uma das principais fontes de proteínas com alto valor biológico. É uma excelente fonte de vitaminas do complexo B e de minerais, como o ferro e o zinco, satisfaz boa parte das necessidades diárias destes nutrientes vitais e, desta forma, traz excelentes contribuições para a saúde humana. Apesar destas qualidades, alguns pesquisadores não recomendam seu consumo, principalmente devido ao elevado teor de gorduras saturadas, um fator de risco associado a casos de doenças coronárias e ao câncer<sup>2,3</sup>. Diante dessa realidade, a carne de avestruz torna-se uma alternativa mais saudável, considerando seu menor teor de gordura, elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados e quantidades menores de colesterol<sup>4</sup>.

Os maiores mercados consumidores de carne de avestruz são os Estados Unidos e Europa<sup>5</sup>. A Suíça, por exemplo, importa 200-300 toneladas por ano de carne de avestruz, enquanto que o consumo europeu de carnes tradicionais (boi, porco e frango) vem diminuindo desde 1991. No Brasil, o mercado de carne de avestruz vem crescendo devido à iniciativa de um número cada vez maior de produtores que têm direcionado suas criações para venda de animais e para abate<sup>6</sup>. O país já detém o segundo maior plantel de avestruzes do mundo, ficando atrás apenas da África do Sul. Nos últimos anos, o plantel nacional cresceu vertiginosamente, pulando de 120 mil aves no ano de 2003 para aproximadamente 430 mil no ano de 2007<sup>7</sup>.

A carne de avestruz, normalmente consumida *in natura*, possui coloração mais acentuada e menos

colágeno<sup>8</sup>, quando comparada à carne de boi, podendo ser melhor explorada para uso na elaboração de produtos cárneos tais como salsichas, linguiças e hambúrgueres, entre outros.

O hambúrguer é um alimento popular pela praticidade que representa atualmente. Esse produto é fabricado a partir de carne moída, adição de gordura ou não, ingredientes (sabores) e moldado. Possui nutrientes que alimentam e sacia a fome rapidamente, o que combina com o atual modo de vida dos habitantes dos centros urbanos<sup>9</sup>. Os hambúrgueres convencionais (bovino, frango) possuem elevado nível de gordura (20 a 30%) e a maioria dos hambúrgueres com teor reduzido possui cerca de 10% desse componente<sup>10</sup>.

Considerando a necessidade de oferta de alimentos saudáveis, tem-se como objetivo nesta pesquisa aproveitar cortes de menor valor comercial do músculo da coxa de avestruz na elaboração de um produto (hambúrguer) bastante consumido na atualidade, contendo menos teores de gordura com a substituição da mesma por amido modificado, bem como realizar diversas análises (microbiológica, físico-química e sensorial) visando avaliar diversos parâmetros importantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

A carne de avestruz foi fornecida pela Cooperativa dos Criadores de Avestruz da Paraíba (Coovestruz-PB), localizada em João Pessoa, e pela empresa Grandave Empreendimentos Rurais Ltda., localizada na cidade de Natal-RN/Brasil. Essa última possui registro no Serviço de Inspeção Federal. O músculo da coxa interna de avestruz, sem osso, foi transportado até o Núcleo de Pesquisa e Produção de Alimentos (NUPPA) em caixas isotérmicas, sendo posteriormente mantido à temperatura de -18°C. Os procedimentos de coleta e transporte das amostras foram realizados de acordo com as recomendações descritas por Franco e Landgraf<sup>11</sup>.

O amido de mandioca modificado (National Frigex) foi cedido pela empresa *National Starch Food Innovation*, localizada em Santa Catarina. O condimento próprio para hambúrgueres, o emulsificante e o fixador de cor, foram cedidos pela empresa KRAKI, localizada em Santo André-SP/Brasil. Os demais ingredientes das formulações (pimenta do reino, alho, cominho, noz moscada, sal e óleo vegetal) foram adquiridos em estabelecimentos comerciais de João Pessoa-PB/ Brasil.

## Métodos

### ■ Elaboração dos hambúrgueres

As formulações dos hambúrgueres de avestruz estão expressas na Tabela 1.

Os músculos da coxa de avestruz foram triturados em moedor de carnes, com disco de 5 mm. Após a moagem, os ingredientes foram misturados a carne, manualmente. Em seguida, toda a massa foi prensada e modelada em hamburgueira manual de 11 cm de diâmetro, obtendo hambúrgueres com peso líquido entre 68-73g cada, sendo o produto protegido de ambos os lados com papel celofane. Os hambúrgueres foram acondicionados em sacos de polietileno, que continham duas unidades por embalagem e armazenados em freezer horizontal (Metalfrio DA420) a -5°C por 3 dias. Após esse período de armazenamento, amostras foram coletadas para a realização das análises microbiológicas, físicas e físico-químicas. Para os testes sensoriais, as amostras foram coletadas após sete dias de estocagem.

As formulações elaboradas diferiram nos ingredientes quanto ao teor de gordura adicionado e de amido modificado, onde: F1 – contém 5% de gordura suína sem adição de amido modificado; F2 – contém

3% de gordura suína e 2% de amido modificado; F3 – contém 2% de amido modificado sem adição de gordura e F4 – contém 3% de gordura vegetal e 2% de amido modificado. Os demais ingredientes permaneceram inalterados.

### ■ Análises microbiológicas

O Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, a pesquisa de *Salmonella*, a contagem de *Clostridium* sulfito redutores e de *Staphylococcus* coagulase positiva foram realizados de acordo com as técnicas descritas na Instrução Normativa nº 62 de 26 agosto de 2003 do Ministério da Agricultura<sup>12</sup>.

### ■ Análises físico-químicas

As determinações de umidade (012/IV), amido (043/IV), resíduo mineral fixo (018/IV), proteínas (036/IV) e lipídios (032/IV) foram realizadas seguindo os métodos descritos em “Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos”<sup>13</sup>.

O percentual de rendimento dos hambúrgueres foi calculado pela diferença entre o peso da amostra obtido antes e após o cozimento, de acordo com Berry<sup>14</sup>. A capacidade de retenção de água (CRA) foi calculada de acordo com Troy, Desmond e Buckley<sup>15</sup>.

**Tabela 1.** Matéria-prima e ingredientes utilizados para formulação dos hambúrgueres de avestruz

Matéria-Prima /Insumos	Formulações							
	F1 (%)	(g)	F2 (%)	(g)	F3 (%)	(g)	F4 (%)	(g)
Carne desossada de avestruz	80	2000	80	2000	80	2000	80	2000
Gordura suína	5	125	3	75	-	-	-	-
Gordura vegetal	-	-	-	-	-	-	3	75
Amido modificado	-	-	2	50	2	50	2	50
Sal refinado	0,7	17,5	0,7	17,5	0,7	17,5	0,7	17,5
Condimentos para hambúrguer	2	50	2	50	2	50	2	50
MIX de condimentos*	0,6	15	0,6	15	0,6	15	0,6	15
Gelo em flocos	11,2	280	11,2	280	14,2	355	11,2	280
Fixador de cor	0,25	6,25	0,25	6,25	0,25	6,25	0,25	6,25
Krakoline estabilizante	0,25	6,25	0,25	6,25	0,25	6,25	0,25	6,25
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>2500</b>	<b>100</b>	<b>2500</b>	<b>100</b>	<b>2500</b>	<b>100</b>	<b>2500</b>

\*Composição do MIX (15g) = Pimenta do reino (0,1%); Alho (0,2%); Cominho (0,2%); Noz Moscada (0,1%).

F1 = contém 5% de gordura suína sem adição de amido modificado; F2 = contém 3% de gordura suína e 2% de amido modificado; F3 = contém 2% de amido modificado sem adição de gordura e F4 = contém 3% de gordura vegetal e 2% de amido modificado.

### ■ Avaliação sensorial

Todas as amostras foram avaliadas sete dias após a produção, em cabines individuais, sendo servidas em pratos plásticos, devidamente codificados (três dígitos), acompanhadas de um copo de água mineral e ¼ de pão de forma, para limpeza das papilas gustativas. Os hambúrgueres foram cozidos em chapa aquecida a 150°C por eletricidade, por aproximadamente 10 minutos, sendo virados a cada 2 minutos até alcançarem uma temperatura interna de 71°C, monitorada através de termômetro digital tipo espeto em aço inoxidável com escala de -50°C a +300°C (Modelo Itte-350).

As quatro formulações de hambúrgueres de avestruz foram submetidas ao teste de aceitação, sendo avaliados os seguintes atributos: cor, aroma, maciez, sabor e avaliação geral, utilizando escala hedônica de nove pontos com notas de 1: desgostei muitíssimo até 9: gostei muitíssimo, segundo metodologia citada por Anzaldúa-Morales<sup>16</sup>. O critério adotado para a aceitação dos hambúrgueres foi à obtenção de escores médios  $\geq 6,0$  (equivalente ao termo hedônico gostei ligeiramente). Para o teste de intenção de compra foi utilizada uma escala estruturada em cinco pontos, onde os julgadores atribuíram notas de 1 (jamais compraria o produto) até 5 (compraria o produto). As quatro formulações também foram comparadas quanto à preferência, sendo solicitado que colocassem as amostras em ordem crescente de sua preferência. De acordo com os resultados obtidos, foi selecionada uma única formulação dentre as quatro testadas. Esses testes foram conduzidos com

50 provadores não treinados, escolhidos por serem potenciais consumidores de hambúrgueres, compostos por alunos de graduação, docentes e funcionários da Universidade Federal da Paraíba.

### ■ Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas e do teste sensorial de aceitação foram submetidos aos cálculos de média, desvio padrão e Análise de Variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, na comparação das médias, utilizando-se o programa estatístico "R"<sup>17</sup>.

Os resultados do teste de ordenação preferência foram analisados com base no teste de soma de ordens de Friedman, utilizando-se a tabela de Newel e MacFarlane<sup>18</sup>, a qual indica a diferença crítica entre os totais de ordenação, ao nível de significância de 5%, de acordo com o número de tratamentos testados e o número de julgamentos obtidos. No teste de intenção de compra foi verificada a frequência das notas, usando um histograma de colunas<sup>19</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação microbiológica

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas dos hambúrgueres de avestruz estão descritos na Tabela 2. De acordo com esses resultados, os hambúrgueres formulados com carne de avestruz estão dentro dos

**Tabela 2.** Resultados das análises microbiológicas dos hambúrgueres de avestruz adicionados de amido modificado

Formulações	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Pesquisa de <i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/g)	<i>Clostridium sulfito redutor</i> a 46°C/g (UFC/g)
F1	4,2 x 10 <sup>2</sup>	Ausente	4,5 x 10 <sup>2</sup>	Ausente
F2	3,9 x 10 <sup>2</sup>	Ausente	4,1 x 10 <sup>2</sup>	Ausente
F3	2,2 x 10 <sup>2</sup>	Ausente	4,3 x 10 <sup>2</sup>	Ausente
F4	2,1 x 10 <sup>2</sup>	Ausente	4,2 x 10 <sup>2</sup>	Ausente
Padrões microbiológicos	5 x 10 <sup>3</sup>	Ausência/25 g	5 x 10 <sup>3</sup>	3 x 10 <sup>3</sup>

**Nota:** Determinações preconizadas pela RDC nº 12 de 02 janeiro de 2001<sup>19</sup>

(NMP) – Número Mais Provável;

(UFC) – Unidades Formadoras de Colônias;

F1 = contem 5% de gordura suína sem adição de amido modificado; F2 = contem 3% de gordura suína e 2% de amido modificado; F3 = contem 2% de amido modificado sem adição de gordura e F4 = contem 3% de gordura vegetal e 2% de amido modificado.

padrões aceitáveis para consumo humano, de acordo com a Resolução RDC n. 12 da Agência Nacional da Vigilância Sanitária<sup>20</sup>, podendo ser empregados na análise sensorial.

Como se pode observar na Tabela 2, em nenhuma das amostras foi verificada a presença de *Salmonella* e de *Clostridium* sulfito redutor a 46°C/g. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva variou de  $4,1 \times 10^2$  a  $4,5 \times 10^2$  UFC/g. Todas as amostras estavam com contagens abaixo do máximo estabelecido pela legislação vigente.

### ■ Avaliação físico-química

O resultado da análise da composição físico-química do hambúrguer de avestruz adicionado de amido modificado está descrita na Tabela 3.

Dos resultados obtidos pode-se observar que o teor de umidade dos hambúrgueres de carne de avestruz analisados não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si. Resultados próximos foram encontrados por Fernández-López et al.<sup>8</sup>, para hambúrgueres de avestruz (F1- 68,67%; F2- 69,11% e F3- 64,45%). Seabra et al.<sup>21</sup>, quando avaliaram hambúrgueres de carne de carneiro com substitutos de gordura (fécula de mandioca e farinha de aveia) verificaram teores de umidade próximos dos obtidos nesta pesquisa.

O regulamento técnico de identidade e qualidade de hambúrguer<sup>22</sup> estabelecido pela legislação brasileira vigente exige teor mínimo de 15% para proteínas e máximo de 23% para lipídios. Com relação a esses padrões, todas as amostras de hambúrguer estavam de acordo. Não houve diferença entre as amostras ( $p > 0,05$ )

em relação ao teor de proteínas, que variou de 19,93 a 20,39% (Tabela 3). Fernández-López et al.<sup>8</sup> encontraram teores de proteínas próximos aos valores encontrados nessa pesquisa para hambúrgueres de avestruz.

Quando outras fontes de proteínas foram usadas (proteína de soja) o teor de proteínas também ficou em torno de 20%<sup>23</sup>. Para os lipídios, foi verificada diferença entre as amostras ( $p < 0,05$ ), sendo esta esperada, especialmente no hambúrguer da formulação (F3) não foi adicionado gordura.

A Portaria nº. 27 de 13 de janeiro de 1998<sup>24</sup> define como “reduzido em gordura” o produto que apresenta uma redução mínima de 25% de gordura quando comparado ao produto convencional. Nos teores de lipídios encontrados observa-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras, o que já era esperado visto que os percentuais de gordura adicionados são diferentes para cada formulação, principalmente em relação a formulação F3 onde não houve a adição de gordura. Para os hambúrgueres formulados nesta pesquisa, poder-se-ia classificar (F1 com 6,93% de lipídios, F2 com 6,61%, F3 com 3,69% e F4 com 6,17%) como tendo teor reduzido de gordura, já que apresentaram redução entre 70 e 85%, em relação aos produtos convencionais formulados com carne bovina, que possuem cerca de 20% de gordura antes do cozimento<sup>25,26</sup>.

Como pode ser observado, os teores de amido das amostras analisadas tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si. Na formulação F1, o amido modificado não foi adicionado, ficando seu valor bem abaixo do observado nas outras formulações (F2, F3 e F4), que receberam a adição desse ingrediente. Pedroso

**Tabela 3.** Resultados das análises físico-químicas do hambúrguer de avestruz adicionado de amido modificado

Variável	Formulações			
	F1	F2	F3	F4
Umidade (g/100g)	69,13 ± 0,12 <sup>a</sup>	65,03 ± 0,14 <sup>a</sup>	68,97 ± 0,15 <sup>a</sup>	69,13 ± 0,49 <sup>a</sup>
Proteínas (g/100g)	20,39 ± 0,38 <sup>a</sup>	19,93 ± 0,70 <sup>a</sup>	20,29 ± 0,22 <sup>a</sup>	20,15 ± 0,48 <sup>a</sup>
Lipídios (g/100g)	6,93 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,12 <sup>b</sup>	3,69 ± 0,10 <sup>d</sup>	6,17 ± 0,02 <sup>c</sup>
Amido (g/100g)	0,51 ± 0,06 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,03 ± 0,02 <sup>a</sup>
Cinzas (g/100g)	1,97 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,01 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

F1 = contém 5% de gordura suína sem adição de amido modificado; F2 = contém 3% de gordura suína e 2% de amido modificado; F3 = contém 2% de amido modificado sem adição de gordura e F4 = contém 3% de gordura vegetal e 2% de amido modificado.

e Demiate<sup>27</sup>, ao avaliarem presunto cozido de peru também detectaram amido na formulação controle, que não recebeu adição, enquanto que nas formulações adicionadas de 2% de amido, os resultados obtidos foram menores do que o acrescido, contrariamente aos obtidos nessa pesquisa.

Com relação ao teor de cinzas, não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras, sendo os resultados obtidos próximos dos encontrados por Fernández-López et al.<sup>8</sup>, que variaram entre 1,86 e 1,95 nas amostras de hambúrgueres de avestruz.

A formulação sem adição de amido modificado (F1), apresentou o menor rendimento (72,74%), enquanto que as formulações adicionadas desse ingrediente (F2, F3 e F4) apresentaram rendimentos maiores, que foi de 79,63%, 85,86% e 80,94%, respectivamente. Esse ganho no rendimento pode ser explicado pela maior capacidade de retenção de água (CRA) dos hambúrgueres adicionados de amido. Seabra et al.<sup>21</sup> encontraram valores menores de rendimento na cocção para as formulações de hambúrgueres de carne ovina, adicionadas de amido de mandioca e farinha de aveia (72,77% e 75,92%, respectivamente). Swan, Esguerra, Farouk<sup>28</sup> encontraram 77,1% de CRA em hambúrgueres feitos de carne ovina com 20% de gordura na sua formulação.

Observou-se também menor valor de encolhimento na cocção na formulação sem adição de amido modificado e com teor maior de gordura (F1). Berry<sup>14</sup> verificou que quanto menor o teor de gordura em hambúrgueres bovinos, maior foi o encolhimento, corroborando com a presente pesquisa, onde os hambúrgueres com menor teor de gordura apresentaram maior encolhimento. Seabra et al.<sup>21</sup> observaram percentuais de encolhimento de 15,47% e 15,45%, respectivamente, em formulações adicionadas de fécula de mandioca e farinha de aveia.

#### ■ Avaliação sensorial

Na Tabela 4, encontram-se os valores das médias e desvios-padrão referentes à aceitabilidade dos produtos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A cor foi o único atributo que não apresentou diferença significativa entre as amostras avaliadas em relação à aceitação. Quanto ao aroma, a amostra com 3% de gordura vegetal e 2% de amido modificado (F4) foi a que obteve os maiores valores, tendo se diferenciado das demais amostras. Nos atributos maciez e sabor essa formulação obteve a menor pontuação, indicando sua baixa aceitação. A formulação F3 foi bem aceita, entretanto no atributo maciez, não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparada à formulação F4, que apresentou o pior resultado neste atributo. Portanto, a formulação F2 pode ser considerada a formulação mais aceita, uma vez que obteve as melhores notas atribuídas neste teste.

Na aceitação global das amostras, de acordo com as médias obtidas no teste de aceitação (Tabela 4), é possível considerar que as amostras F1, F2 e F3, independentemente da redução de gordura e da adição de amido de mandioca modificado, foram bem aceitas pelos provadores. No entanto, a formulação F2 foi a que obteve a melhor nota, corroborando assim com a boa aceitação quanto aos atributos.

Romanelli et al.<sup>29</sup> obtiveram nota 4,84 para o hambúrguer de jacaré, quando avaliaram sua aceitação global, estando abaixo do encontrado nesta pesquisa. Daigle et al.<sup>30</sup> realizaram análise sensorial em produtos elaborados com carne de peru pálida, flácida e exudada (PSE) e hidrocolóides como carragena, colágeno e proteína de soja, não sendo detectada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre todos os tratamentos. Eles utilizaram escala hedônica de

**Tabela 4.** Resultados do teste de aceitação dos hambúrgueres formulados nesta pesquisa

Atributos	F1	F2	F3	F4
Cor	6,14 ± 1,63 <sup>a</sup>	6,70 ± 1,49 <sup>a</sup>	6,44 ± 1,59 <sup>a</sup>	6,06 ± 1,98 <sup>a</sup>
Aroma	6,70 ± 1,37 <sup>a</sup>	6,66 ± 1,59 <sup>a</sup>	6,42 ± 1,81 <sup>a</sup>	5,76 ± 2,11 <sup>b</sup>
Maciez	5,54 ± 1,73 <sup>b</sup>	6,56 ± 1,88 <sup>a</sup>	6,30 ± 1,91 <sup>ab</sup>	5,48 ± 2,44 <sup>b</sup>
Sabor	6,40 ± 1,83 <sup>a</sup>	6,50 ± 1,83 <sup>a</sup>	6,00 ± 2,07 <sup>ab</sup>	5,40 ± 2,11 <sup>b</sup>
Aceitação global	6,24 ± 1,62 <sup>a</sup>	6,72 ± 1,53 <sup>a</sup>	6,18 ± 1,93 <sup>a</sup>	5,24 ± 2,21 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.



9 pontos, obtendo escores médios variando entre 6 e 7 (gostou ligeiramente e gostou moderadamente).

Sampaio et al.<sup>31</sup>, ao avaliarem salsichas com substitutos de gordura (amido de mandioca, carragena, farelo de trigo e micro partículas de proteínas de soro de leite), não verificaram no teste de aceitação sensorial diferença significativa entre estas amostras e a amostra-controle, enquanto que a amostra com proteínas de soro de leite apresentou aceitabilidade abaixo de 50%. Seabra et al.<sup>21</sup>, ao realizarem pesquisa com hambúrgueres substituindo a gordura por amido de mandioca e farinha de aveia, não constataram diferença significativa entre as amostras, tanto para aceitação global do produto quanto para atitude de compra. Esse resultado sugere que a redução de gordura dos produtos não foi detectada pelos consumidores, independente da utilização dos substituintes. Lyons et al.<sup>32</sup> afirmaram que a adição de amido desidratado de mandioca teve um efeito positivo nos parâmetros sensoriais e físicos de salsichas com baixo teor de gordura.

Na Figura 1, observamos os resultados do teste de intenção de compra aplicado às quatro formulações de hambúrgueres avaliadas nesta pesquisa. A formulação F4 foi a que obteve maior percentual da nota 1, referente a jamais compraria, indicando a baixa aceitação desta formulação. A formulação F2 obteve o melhor percentual de intenção de compra, confirmando mais uma vez a boa aceitação do produto pelos consumidores.

No teste de ordenação preferência, a formulação F4 obteve a menor preferência. Esse resultado está de acordo com o obtido no teste de aceitação. A formulação F2 foi preferida, quando comparada às formulações F1 e F4, não tendo sido verificada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre esta e F3, quanto à preferência.

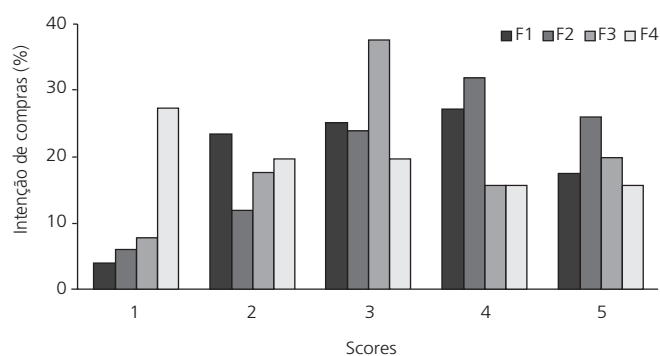


Figura 1. Frequência da intenção de compra das quatro formulações avaliadas

## CONCLUSÃO

Os hambúrgueres elaborados nesta pesquisa estavam aptos para consumo sob o aspecto microbiológico e podem ser classificados como alimentos com teor de gordura reduzido, quando comparados com o hambúrguer bovino comercial. De todas as formulações testadas de carne de avestruz, três tiveram boa aceitação pelos provadores. O hambúrguer formulado com 3% de gordura suína e 2% de amido modificado (F2) foi considerada a formulação mais aceita por apresentar os melhores valores atribuídos na análise sensorial. A adição do amido modificado é uma alternativa para a redução de custos na industrialização do hambúrguer de avestruz, sem prejudicar seus parâmetros sensoriais, além de permitir uma redução da gordura do produto final. Os hambúrgueres formulados apresentaram cor, sabor e aroma característicos do produto e atenderam às necessidades nutricionais de proteínas e lipídios, conforme exige a legislação brasileira. Além disso, este trabalho demonstrou que cortes de menor valor comercial do músculo da coxa de avestruz podem ser utilizados na elaboração do hambúrguer, sendo aceitos em substituição à carne bovina ou de partes mais nobres do avestruz.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela utilização dos laboratórios de microbiologia, bioquímica e ao Núcleo de Pesquisa e Produção de Alimentos (NUPPA) do Centro de Tecnologia. Da mesma forma, agradecemos à Grandave Empreendimentos Rurais Ltda. Natal-RN, na pessoa do Sr. Sergio Melo, a Cooperativa dos Criadores de Avestruz da Paraíba (Coavestruz-PB) na pessoa do Sr. Laurentino e a National Starch Food Innovation pela colaboração para execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Mondini L, Monteiro C. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira. *Rev Saúde Pública* 1994; 6 (28): 433-9.
2. Lennie TA. Current perspectives in nutrition and cardiovascular disease. *J Card Nursing* 2006; 21 (1): 1-2.
3. Lima FEL, Latorre MRDO, Costa MJC, Fisberg RM. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad Saúde Pública*, 2008; 24 (4): 820-8.

4. Fisher P, Hoffman LC, Mellet FD. Processing and nutritional characteristics of value added ostrich products. *Meat Sci* 2000; 55 (2): 251-4.
5. Tel-Katzir. Toca do avestruz. Grupo propectus, 1998. Disponível em: <http://frope.vilabol.uol.com.br/toca9.htm>.
6. Balog A, Mendes AA, Almeida Paz ICL, Silva MC, Takahashi SE, Komiyama CM. Carne de avestruz: rendimento de carcaça e aspectos físicos e químicos. *Ciênc Tecnol Aliment* 2008; 28 (2): 400-7.
7. Suzan E, Gameiro AH. Perspectivas e desafios do sistema agroindustrial do avestruz no Brasil. *Informações Econômicas* 2007; 37 (10): 44-9.
8. Fernández-López J, Jiménez S, Sayas-Barberá E, Sendra E, Pérez-Alvarez JÁ. Quality characteristics of ostrich (*Struthio camelus*) burgers. *Meat Sci* 2006; 73 (2): 295-303.
9. Ariseto AP. Avaliação da qualidade global do hambúrguer tipo calabresa com reduzidos teores de nitrito [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2003. 145p.
10. Giese J. Developing low-fat meat products. *J Food Sci* 1992; 46 (4): 100-8.
11. Franco BDG, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005, 196p.
12. Brasil. Instrução normativa nº 62 de 26/08/2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 18 de setembro de 2003, Seção I, p.14-51.
13. Brasil. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. Brasília. IV Edição, 2005. 1018p.
14. Berry BW. Low fat level effects on sensory, shear, cooking and chemical properties of ground beef patties. *J Food Sci* 1992; 57 (3): 537-40.
15. Troy DJ, Desmond EM, Buckley DJ. Eating quality of low-fat beef burgers containing fat-replacing functional blends. *J Sci Food Agric* 1999; 79 (4): 507-16.
16. Anzaldúa-Morales A. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A, 1994. 220p.
17. R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006.
18. Minim VPR. *Análise sensorial: estudos com consumidores*. Viçosa: Editora. UFV, 2006, 225p.
19. Roessler EB et al. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired difference, duo-trio and triangle tests. *J Food Sci* 1978; 43 (3): 940-3.
20. Brasil. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 19 de set. 2001. Seção 1. p1.
21. Seabra LM, Zapata JFF, Nogueira CM, Dantas MA, Almeida RB. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substituinte de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. *Ciênc Tecnol Alimentos* 2002; 22 (3):245-8.
22. Brasil. Instrução Normativa nº 20 de 31 de Julho de 2000. Aprova regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade de almôndegas, de apresuntado, de fiambre, de Hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 03 de ago. de 2000. Seção 1, p.7.
23. Siqueira PB. Desenvolvimento e Aceitação de Hambúrguer com Baixo Teor de Gordura. *Food Ingred* 2001;14 :74-7.
24. Brasil. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 16 de jan. de 1998, Seção I.
25. Egbert WR, Huffman DL, Chen C, Dylewski DP. Development of low-fat ground beef. *Food Techn* 1991; 45 (6): 66-73.
26. Viviani E. Hamburguesas de bajo contenido graso: necesidad dietética o necesidad de mercado? *La Indústria Cárnica Latinoamericana* 1997; 30 (108): 45-7.
27. Pedroso RA, Demiate IM. Avaliação da influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru. *Ciênc Tecnol Alimentos* 2008; 28 (1): 24-31.
28. Swan JE, Esguerra CM, Farouk MM. Some physical, chemical and sensory properties of chevon products from three New Zealand goat breeds. *Small Ruminant Research* 1998; 28: 273-80.
29. Romanelli PF, Caseri R, Lopes Filho JF. Processamento da Carne de Jacaré do Pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). *Ciênc Tecnol Alimentos* 2002; 22 (1): 70-5.
30. Daigle SP, Schilling MW, Marriott NG, Wang H, Barbeau WE, Williams RC. PSE-like turkey breast enhancement through adjunct incorporation in a chunked and formed deli roll. *Meat Sci* 2005; 69 (2): 319-24.
31. Sampaio GR, Cláudia CMN, Castellucci MN, Maria Elisabeth MPS, Elizabeth AF S T. Effect of fat replacers on the nutritive value and acceptability of beef frankfurters. *J Food Comp Analysis* 2004; 17 (3/4): 469-74.
32. Lyons PH, Kerry JF, Morrissey PA, Buckley DJ. The influence of added whey protein/carrageenan gels and tapioca starch on the textural proprieties of low fat pork sausages. *Meat Sci* 1999; 51 (1): 43-52.

# Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*

Total phenolic compounds, antioxidant and antifungal activities of multimixtures enriched by adding microalgae *Spirulina platensis*

RIALA6/1188

Vânia da Silva BIERHALS<sup>1</sup>, Vanessa Goulart MACHADO<sup>1</sup>, Walesca Oliveira ECHEVENGUÁ<sup>1</sup>, Jorge Alberto Vieira COSTA<sup>1</sup>, Eliana Badiale FURLONG<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus cidade, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, e-mail: dqmebf@furg.br

<sup>1</sup>Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

Recebido: 17.11.2008 – Aceito para publicação: 19.04.2009

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar o conteúdo fenólico e as atividades antioxidantes e antifúngicas de multimisturas enriquecidas com *Spirulina platensis*, foram formuladas quatro multimisturas com farelo de arroz ou trigo, duas contendo *Spirulina platensis* e duas com sementes de girassol. Os compostos fenólicos foram estimados pela técnica de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi avaliada por meio de inibição do radical livre DPPH e a atividade antifúngica foi analisada por meio de ensaio de inibição do halo de crescimento de *Aspergillus orizae*. O conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante nas multimisturas contendo farelo de arroz foram em média 0,6 vezes superiores aos encontrados nas multimisturas contendo farelo de trigo. As multimisturas formuladas com 1% da microalga não apresentaram diferença significativa ( $\alpha=0,05$ ) quanto ao conteúdo fenólico, quando comparadas às multimisturas padrão. A multimistura contendo farelo de arroz e *Spirulina platensis* apresentou maior atividade antioxidante, em comparação à multimistura padrão com o mesmo farelo, ao contrário do observado nas multimisturas contendo farelo de trigo, o que indica que a associação do farelo de arroz com a microalga é mais eficiente do que a formulação com farelo de trigo quanto à proteção contra processos oxidantes. Quanto à atividade antifúngica, as multimisturas com farelo de trigo apresentaram 28% de inibição, comparado a 21% das multimisturas contendo farelo de arroz.

**Palavras-chave.** farelos, microalga, compostos fenólicos, antioxidantes, atividade antifúngica.

## ABSTRACT

With the objective to evaluate the phenolic contents, and the antioxidant and antifungal activities of multimixtures formulated with *Spirulina platensis*, four multimixtures were prepared with rice bran or wheat bran, being two containing the *Spirulina platensis*, and sunflower seeds were added into other two formulations. The phenolic contents were estimated by Folin-Ciocalteu technique; antioxidant activity was evaluated through free radical DPPH inhibition test, and the ability to inhibit fungus by means of *Aspergillus orizae* growth halo inhibition assay. The total phenolic contents and antioxidant activity in rice bran-containing multimixtures were on average 0.6 times higher than those showed by wheat bran-containing multimixtures. The multimixtures formulated with 1% of microalgae showed no significant difference ( $\alpha = 0.05$ ) as for phenolic contents, when compared with the standard multimixture. The multimixture containing rice bran and *Spirulina platensis* showed higher antioxidant activity in comparison to the standard multimixture, unlike the result observed in wheat bran-containing multimixtures, which indicates that the combination of rice bran with microalgae is more effective than with wheat bran for preserving from oxidative processes. Regarding to antifungal activity, the multimixtures with wheat bran demonstrated, on average, 28% of inhibition, when compared to 21% of bran rice-based multimixtures.

**Key words.** bran, microalgae, phenolic compounds, antioxidants, antifungal activity.

## INTRODUÇÃO

A presença de compostos fenólicos em diferentes fontes vegetais e microbianas tem sido amplamente explorada na última década. Além do seu potencial funcional, decorrente de compostos antioxidantes presentes em sua composição, a perspectiva de atuarem como conservadores naturais também vêm norteando o interesse da comunidade científica<sup>1, 2, 3, 4</sup>.

Os antioxidantes agem de várias maneiras, incluindo complexação com íons metálicos, sequestro de radicais livres e decomposição de peróxidos. Muitas vezes, vários mecanismos e mecanismos sinérgicos estão envolvidos<sup>5</sup>. O consumo de alimentos contendo uma significativa quantidade destes compostos pode ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos relacionados ao envelhecimento e doenças como arteriosclerose, diabetes, úlcera e câncer<sup>6, 7, 8, 9</sup>.

A indústria de alimentos está buscando o uso de agentes naturais antimicrobianos e antioxidantes, isolados de plantas, fungos e algas marinhas, para substituir os aditivos sintéticos em alimentos<sup>10</sup>, uma vez que estes trazem efeitos prejudiciais à saúde<sup>11</sup>.

Dentre as fontes naturais que vêm sendo citadas pelo efeito funcional, associadas à capacidade de prevenir processos oxidativos, encontra-se a *Spirulina platensis*<sup>12, 13</sup>. Esta foi estudada por Colla, Furlong e Costa<sup>14</sup>, apontando que as condições de cultivo afetam positivamente os teores de compostos fenólicos presentes na microalga. Outra fonte de compostos antioxidantes é o farelo de arroz, que além desta propriedade demonstrou a capacidade de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus*<sup>1</sup>.

A peroxidação lipídica e a contaminação microbiana são as duas principais causas da deterioração de alimentos durante seu processamento e armazenamento<sup>10</sup>. O uso de compostos fenólicos em alimentos susceptíveis a estes processos pode ser promissor especialmente pelo fato de serem conservadores e por aumentarem o aporte de funcionais. Este é o caso das multimisturas, alimentos formulados a base de cereais, para enriquecer a alimentação habitual em minerais e vitaminas e/ou auxiliar no balanceamento da dieta habitual<sup>15, 16</sup>.

A multimistura tem sido distribuída para a população de baixa renda no Brasil desde 1985 por organizações não-governamentais, com o propósito de combater a desnutrição infantil<sup>17, 18</sup>. Esta mistura faz parte da proposta de alimentação alternativa e é preparada a partir de ingredientes de baixo custo e fácil

acesso, geralmente farinhas e farelos de cereais, sementes, pós de folhas verdes e de casca de ovos<sup>19</sup>. No entanto, o uso deste suplemento no combate à desnutrição tem gerado opiniões controversas entre as entidades que a difundem e a comunidade científica, além de não ter o seu uso indicado pelo Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição e pelo Conselho Federal de Nutricionistas<sup>20</sup>.

Empregar *Spirulina platensis* associada a farelos de cereais pode ser uma forma de melhorar este alimento, criticado no meio acadêmico pela falta de comprovação científica de seus efeitos, ausência de controle sanitário, conservação limitada, possível ocorrência de toxinas e de fatores antinutricionais<sup>21, 22, 23, 24</sup>. Estas considerações nortearam o presente trabalho que teve por objetivo determinar o conteúdo de fenóis totais, a atividade antioxidante e antifúngica em multimisturas adicionadas de *Spirulina platensis*, comparativamente a outra sem adição da microalga.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

As matérias-primas empregadas no preparo das multimisturas foram: farelo de trigo, farelo de arroz integral, farinha de milho, folha de mandioca desidratada em pó, semente de girassol, casca de ovo e a microalga *Spirulina platensis*. As matérias-primas foram adquiridas no comércio local da cidade do Rio Grande/RS, com exceção da microalga, que foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG.

### Métodos

#### ■ Preparo da multimistura

A semente de girassol, a *Spirulina platensis* e a casca de ovo foram moídas em moinho de facas multiuso TECNAL a 150 rpm durante 180 segundos. Todos os ingredientes foram peneirados e as frações passantes na malha com abertura de 0,56 mm foram utilizadas no preparo das multimisturas, através de homogeneização manual. As amostras foram mantidas em frascos de vidro, à temperatura ambiente (16 a 22°C) e ao abrigo da luz. As multimisturas foram avaliadas quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antifúngica, sendo que as duas primeiras determinações foram repetidas ao final de 14 e 28 dias de armazenamento, para verificar a possível degradação dos compostos e consequente alteração da atividade antioxidante. Na Tabela 1 estão descritos os percentuais dos ingredientes das quatro formulações de multimisturas utilizadas neste trabalho.

**Tabela 1.** Formulação das multimisturas estudadas

Matéria-Prima	MMA1 (%)	MMT1 (%)	MMA (%)	MMT (%)
Farelo de Trigo	-	70	-	70
Farelo de Arroz	70	-	70	-
Farinha de Milho	19	19	19	19
Folha de Mandioca	5	5	5	5
Spirulina platensis	1	1	-	-
Semente de Girassol	-	-	1	1
Casca de ovo	5	5	5	5

MMA1: Multimistura contendo farelo de arroz e 1% de *Spirulina platensis*.

MMT1: Multimistura contendo farelo de trigo e 1% de *Spirulina platensis*.

MMA: Multimistura contendo farelo de arroz e 1% de semente de girassol.

MMT: Multimistura contendo farelo de trigo e 1% de semente de girassol.

#### ■ Extração dos compostos denólicos

A extração dos compostos fenólicos das multimisturas foi realizada a frio com álcool metílico na proporção de 1:4 massa seca-solvente, sob agitação horizontal a 80 rpm, durante 3 horas, a temperatura de 40°C, seguida de partição com hexano, clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5%. O precipitado foi separado por centrifugação e filtração, obtendo-se assim um extrato metanólico clarificado<sup>25</sup>.

#### ■ Quantificação dos compostos fenólicos

O conteúdo de fenóis totais presente no extrato metanólico clarificado foi quantificado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando o comprimento de onda de 660 nm, empregando-se uma curva analítica de tirosina que variava entre 10 a 50 µg/mL<sup>25</sup>.

#### ■ Determinação da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL do extrato metanólico clarificado e adicionadas a tubos de ensaio, completando o volume a 1,0 mL com metanol. Na sequência, 3,0 mL de solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) em metanol (200µg/mL) foram adicionados aos tubos e estes foram agitados. Os tubos permaneceram em repouso ao abrigo da luz, sendo que ao final de 15, 30, 45 e 60 minutos as absorbâncias foram determinadas em comprimento de onda de 515 nm. A capacidade de sequestrar o radical foi expressa como percentual de inibição dos radicais livres, conforme mostrado na Equação 1<sup>3</sup>.

$$\% \text{ inibição} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle} \quad (1)$$

#### ■ Determinação da atividade antifúngica

Os extratos empregados para a determinação da atividade antifúngica foram obtidos por extração com álcool metílico na proporção de 1:4 massa seca-solvente, sob agitação horizontal a 80 rpm, durante três horas, à temperatura de 40°C, seguido de evaporação do solvente em rotaevaporador. O resíduo foi dissolvido em água destilada, com posterior clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5%, obtendo-se um extrato aquoso clarificado. A quantificação do teor de fenóis totais presente no extrato aquoso clarificado foi realizada conforme a metodologia já citada anteriormente<sup>25</sup>.

O fungo filamentososo utilizado no estudo foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia da Escola de Química e Alimentos da FURG, mantido em ágar batata dextrose a 4 °C. A suspensão de esporos foi obtida pela propagação em meio ágar batata dextrose, incubação por 10 dias a 30 °C, extração dos esporos do meio com solução 0,2% de ágar puro estéril, filtração e contagem de esporos em câmara de Neubauer.

Para a determinação da atividade antifúngica, foram preparadas placas de petri contendo ágar batata dextrose e o extrato aquoso clarificado obtido das multimisturas (200 mg/mL) e da *Spirulina platensis* (100 mg/mL) em concentrações conhecidas. Como controle, foram preparadas placas contendo meio de cultura e água estéril no mesmo volume adicionado do extrato aquoso clarificado. Foram inoculados 5 µL de uma suspensão contendo esporos de *Aspergillus oryzae* (7x10<sup>7</sup> esporos/mL) no centro da placa. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 7 dias. A inibição foi avaliada pela obser-



vação visual do crescimento do micélio, comparada com placas controle<sup>1</sup>.

#### ■ Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos nos experimentos foram analisados estatisticamente através de ANOVA e Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, com auxílio do programa STATISTIC<sup>®</sup>, versão 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### ■ Fenóis totais e atividade antioxidante

Na Tabela 2 estão os resultados das determinações dos compostos fenólicos totais durante o período de armazenamento. É possível verificar que, ao longo de 28 dias, os teores decresceram progressivamente. A análise de variância indicou diferença estatística significativa, ao nível de 95% de confiança, entre as multimisturas que continham farelo de arroz na sua formulação, nos três períodos avaliados no estudo. Nas multimisturas que continham farelo de trigo, apenas a formulada com 1% de *Spirulina platensis* apresentou diferença estatística significativa após 14 dias de armazenamento. Os resultados indicaram que o acréscimo de 1% de *Spirulina* não causou diferença significativa nos níveis de compostos fenólicos totais, o que pode ter aportado concentrações insuficientes para prevenir danos oxidativos e pela atividade de água do meio não propiciar a difusão eficiente do antioxidante. O conteúdo de compostos fenólicos totais nas multimisturas contendo farelo de arroz foi, em média, 0,6 vezes superior ao conteúdo das multimisturas contendo farelo de trigo.

A atividade antioxidante de um determinado extrato pode estar relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos totais conforme tem sido demonstrado em vários estudos e no caso de Colla, Furlong e Costa<sup>14</sup> e Estrada, Bescós e Villar Del Fresno<sup>26</sup> esta relação ficou demonstrada.

Os resultados encontrados para a porcentagem de inibição de radicais livres em uma concentração de 3,7 mg/mL de compostos fenólicos totais nas multimisturas estão apresentados na Tabela 3. Os extratos de multimisturas com farelo de arroz, que continham maior concentração de compostos fenólicos totais, apresentaram também maior percentual de inibição de radicais livres.

Em relação à *Spirulina platensis*, observou-se que a multimistura contendo farelo de arroz adicionada da microalga apresentou maior atividade antioxidante, comparada a multimistura padrão com o mesmo farelo. O mesmo comportamento não foi observado nas multimisturas contendo farelo de trigo, indicando que a associação do farelo de arroz com a microalga é mais efetiva do que com farelo de trigo em termos de proteção contra processos oxidativos na etapa de formação de radicais livres, possivelmente pelo efeito sinérgico dos compostos antioxidantes do farelo com os fenóis da microalga. Um efeito semelhante foi encontrado por Altunkaya, Becker, Gökmen e Skibsted<sup>27</sup>, que determinaram a atividade antioxidante do extrato de alface (*Lactuca sativa*) e a ação sinérgica com antioxidantes fenólicos adicionados ao extrato.

Da mesma forma que observado para o conteúdo de compostos fenólicos, o percentual de inibição de radicais livres foi diminuindo durante o armazenamento, indicando o consumo dos antioxidantes ao longo do

**Tabela 2.** Conteúdo fenólico total determinado durante 28 dias de armazenamento

Multimistura	[ ] µg /g de amostra (bs)			
	0 dia*	14 dias*	28 dias*	**
MMA1	868 <sup>a</sup>	833 <sup>b</sup>	746 <sup>c</sup>	982 <sup>d</sup>
MMA	870 <sup>a</sup>	833 <sup>b</sup>	746 <sup>c</sup>	980 <sup>d</sup>
MMT1	552 <sup>a</sup>	491 <sup>b</sup>	482 <sup>b</sup>	425 <sup>c</sup>
MMT	521 <sup>a</sup>	513 <sup>a</sup>	509 <sup>a</sup>	446 <sup>b</sup>
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	858

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ); bs: base seca; \*determinação no extrato metanólico clarificado; \*\*determinação no extrato aquoso clarificado.

**Tabela 3.** Variação da inibição dos radicais livres DPPH (%) em extratos de multimistura durante 28 dias de armazenamento

	MMA1			MMA			MMT1			MMT		
	0 dia	14 dias	28 dias	0 dia	14 dias	28 dias	0 dia	14 dias	28 dias	0 dia	14 dias	28 dias
15 min.	63,8 <sup>a</sup>	62,2 <sup>a</sup>	60,0 <sup>b</sup>	59,1 <sup>a</sup>	55,4 <sup>b</sup>	54,3 <sup>b</sup>	40,9 <sup>a</sup>	33,4 <sup>b</sup>	29,2 <sup>c</sup>	41,7 <sup>a</sup>	36,9 <sup>b</sup>	36,6 <sup>b</sup>
30 min.	73,5 <sup>a</sup>	71,7 <sup>a</sup>	66,2 <sup>b</sup>	64,9 <sup>a</sup>	58,5 <sup>b</sup>	59,2 <sup>b</sup>	44,3 <sup>a</sup>	37,1 <sup>b</sup>	30,9 <sup>c</sup>	44,2 <sup>a</sup>	40,3 <sup>b</sup>	38,8 <sup>c</sup>
45 min.	79,5 <sup>a</sup>	78,3 <sup>a</sup>	70,1 <sup>b</sup>	68,5 <sup>a</sup>	66,2 <sup>b</sup>	64,1 <sup>c</sup>	47,9 <sup>a</sup>	38,8 <sup>b</sup>	31,1 <sup>c</sup>	45,5 <sup>a</sup>	42,6 <sup>b</sup>	42,1 <sup>b</sup>
60 min.	82,0 <sup>a</sup>	80,2 <sup>b</sup>	69,4 <sup>c</sup>	70,5 <sup>a</sup>	68,6 <sup>a</sup>	65,7 <sup>b</sup>	48,2 <sup>a</sup>	40,3 <sup>b</sup>	34,1 <sup>c</sup>	48,2 <sup>a</sup>	43,8 <sup>b</sup>	44,3 <sup>b</sup>

Letras iguais na mesma linha (para cada multimistura) indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

tempo, para estabilização dos radicais livres. A exemplo da multimistura com farelo de trigo e 1% de *Spirulina platensis* (MMT1) que no tempo zero apresentou uma inibição específica de 1,5%/min/mg e ao final de 28 dias apresentou inibição de 1,2%/min/mg. O mesmo comportamento foi verificado nas demais multimisturas quando se estimou a inibição específica.

#### ■ Atividade antifúngica

Há muitos indícios que compostos fenólicos apresentam comprovada ação antifúngica e esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela inativação de sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais<sup>1</sup>.

Pela Tabela 2 pode ser observado que nas multimisturas contendo farelo de arroz o conteúdo fenólico determinado no extrato aquoso clarificado foi, em média, o dobro do presente nas multimisturas contendo farelo de trigo. Na microalga *Spirulina platensis*, os valores de concentração de compostos fenólicos foram próximos ao total das multimisturas formuladas com farelo de arroz.

O teste de atividade antifúngica avaliado pela inibição do halo de crescimento do *Aspergillus orizae* permitiu verificar quais os extratos mais efetivos e estimar os níveis de fenóis totais para a manifestação do efeito. A Tabela 4 mostra os resultados do crescimento das colônias em presença dos extratos fenólicos medidos no 3°, 5° e 7° dia de incubação. Em presença dos extratos fenólicos, houve tendência à diminuição da velocidade de crescimento fúngico. Fato que não foi observado nas multimisturas onde o número de UFC variou entre 4,8 a

$9,9 \times 10^4$  ufc/g ao longo do armazenamento. Possivelmente este potencial inibidor dos compostos fenólicos possa não ter sido eficiente nas condições de atividade de água da formulação (em média 8,6% de umidade).

A partir dos diâmetros médios das colônias dos extratos e do controle, foi possível determinar o efeito inibitório dos extratos fenólicos das multimisturas e da microalga *Spirulina platensis* nas diferentes concentrações estudadas, durante o período de incubação, conforme mostra a Figura 1.

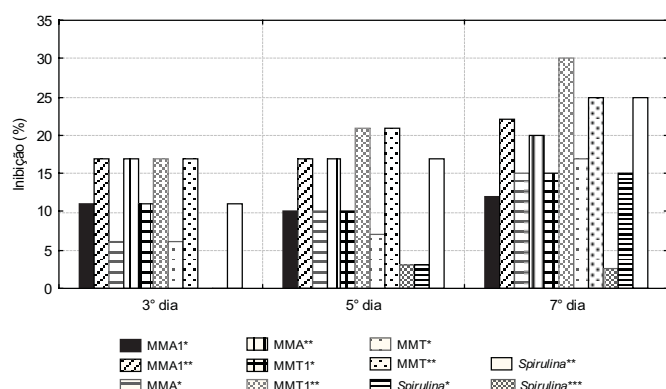
Pode ser verificado que a inibição fúngica nem sempre está relacionada com a concentração dos compostos fenólicos nos extratos, como, por exemplo, no caso das multimisturas formuladas com farelo de trigo e da microalga *Spirulina platensis*, onde em concentrações menores de fenóis (28 e 29  $\mu\text{g fenóis/mL}$  ágar), a inibição fúngica foi de  $3,1 \cdot 10^{-3}$  cm/ $\mu\text{g fenóis/dia}$  e  $2,9 \cdot 10^{-3}$  cm/ $\mu\text{g fenóis/dia}$ , respectivamente. Enquanto as multimisturas com farelo de arroz, que continham maior concentração de compostos fenólicos (84  $\mu\text{g / mL}$  ágar), atingiram apenas  $1,5 \cdot 10^{-3}$  cm/ $\mu\text{g/dia}$  de inibição. Tal característica sugere a necessidade de se identificar os compostos fenólicos existentes nos extratos, considerando que alguns possuem atividades antimicrobianas maiores ou menores em consequência de sua estrutura química<sup>1</sup>.

O menor crescimento fúngico verificado nos extratos de multimisturas formuladas com farelo de trigo, também pode ser atribuído à presença de inibidores de  $\alpha$ -amilase, que atuam na defesa de plantas contra predadores e microrganismos e que estão presentes nesta matéria-prima, como mencionam Grossi de Sá e Chrispeels<sup>28</sup>. No meio elaborado com 9  $\mu\text{g}$  de

**Tabela 4.** Diâmetros médios de crescimento do *Aspergillus oryzae* em presença dos extratos fenólicos

Extrato	Volume de extrato (mL)	Concentração (µg/mL ágar)	Diâmetro da colônia (cm)		
			3° dia	5° dia	7° dia
MMA1	10	65	1,6 <sup>a, d</sup>	2,6 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a, d</sup>
MMA1	15	84	1,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>b</sup>	3,1 <sup>b</sup>
MMA	10	65	1,7 <sup>b, d</sup>	2,6 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a, d</sup>
MMA	15	84	1,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>b, d</sup>	3,2 <sup>b, d</sup>
MMT1	10	28	1,6 <sup>a, d</sup>	2,6 <sup>a</sup>	3,4 <sup>b, d</sup>
MMT1	15	36	1,5 <sup>a, e</sup>	2,3 <sup>b, e</sup>	2,8 <sup>b, e</sup>
MMT	10	30	1,7 <sup>b, d</sup>	2,7 <sup>a</sup>	3,3 <sup>b, d</sup>
MMT	15	38	1,5 <sup>a, f</sup>	2,3 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b, e</sup>
<i>Spirulina platensis</i>	5	9	1,8 <sup>b, g</sup>	2,8 <sup>c</sup>	3,9 <sup>c</sup>
<i>Spirulina platensis</i>	10	29	1,8 <sup>b, g</sup>	2,8 <sup>c</sup>	3,4 <sup>b, d</sup>
<i>Spirulina platensis</i>	15	37	1,6 <sup>a, d</sup>	2,4 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b, e</sup>
Controle	-	-	1,8 <sup>c, g</sup>	2,9 <sup>c</sup>	4,0 <sup>c</sup>

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).



**Figura 1.** Efeito inibitório dos extratos fenólicos no crescimento fúngico durante o período de incubação, para diferentes volumes de extratos adicionados: \*10mL, \*\*15mL, \*\*\*5 mL.

extrato fenólico de *Spirulina platensis* por mL de ágar, correspondente ao teor de 1% desta na multimistura, não houve efeito inibitório do fungo até o 3° dia de incubação, mas entre o 5° e 7° dias a inibição foi de aproximadamente 3%. Quando o meio continha 37 µg /mL ágar ocorreu inibição de 11, 17 e 25% nos 3°, 5° e 7° dias de incubação, respectivamente. Isto sugere que, para o efeito inibidor da microalga sobre a vida útil de multimisturas, no que se refere à inibição fúngica, são necessários aproximadamente 4% da

microalga na formulação, valor este que precisaria ser estudado quanto aos seus outros efeitos biológicos e os níveis recomendados pela legislação para emprego de microrganismos em formulação alimentícias.

## CONCLUSÃO

As multimisturas a base de farelo de arroz apresentaram conteúdo de compostos fenólicos totais em torno de 0,6 vezes superior aos das multimisturas a base de farelo de trigo e a microalga *Spirulina platensis* apresentou conteúdo similar ao das multimisturas contendo farelo de arroz (858 µg/g). O acréscimo de 1% de *Spirulina* não ocasionou diferença significativa no teor de compostos fenólicos das multimisturas.

Os extratos das multimisturas formuladas com farelo de arroz apresentaram percentual de inibição de radicais livres 0,6 vezes superior aos das multimisturas formuladas com farelo de trigo. Além disso, a multimistura contendo farelo de arroz adicionada da microalga apresentou maior atividade antioxidante, comparada a multimistura padrão com o mesmo farelo. Efeito que não foi observado nas multimisturas contendo farelo de trigo, indicando que a associação do farelo de arroz com a microalga é mais efetiva do

que com farelo de trigo em termos de proteção contra processos oxidativos.

A inibição fúngica não foi diretamente relacionada com níveis de compostos fenólicos presente nos extratos, pois nas multimisturas a base de farelo de trigo e com a microalga *Spirulina platensis* foram verificadas atividades antifúngicas superiores às obtidas nas multimisturas a base de farelo de arroz, que continham as maiores concentração dos compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS

- Oliveira MS, Badiale-Furlong E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal* 2008; 2 (1): 1-10.
- Shahid F, Alasalvar C, Liyana-Pthirana C. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana*, L.) and hazelnut byproducts. *J Agric Food Chem* 2007; 55 (4): 4705-12.
- Broinizi PRB, Andrade-Wartha ERS, Silva AMO, Novoa AJV, Torres RP, Azeredo HMC. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Cienc Tecnol Aliment* 2007; 27 (4): 902-8.
- Hassimotto NMA, Genovese IM, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits vegetables and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (8): 2928-35.
- Oliveira AC, Valentim IB, Silva CA, Bechara EJH, Barros MP, Mano CM, Goulart MOF. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chem* 2009; 115 (2): 469-75.
- Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35 (5): 523-34.
- Sachidanandam K, Fagan SC, Ergul A. Oxidative stress and cardiovascular disease: Antioxidants and unresolved issues. *Cardiovasc Drug Rev* 2005; 23 (2): 115-32.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401 (1): 1-11.
- Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca VA. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (1): 16-28.
- Cao L, Si JY, Liu Y, Sun H, Jin W, Li Z, Zhao XH, Le Pan R. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chem* 2009; 115 (3): 801-5.
- Devi MKA, Gondi M, Sakthivelu G, Giridhar P, Rajasekaran T, Ravishankar GA. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chem* 2009; 114 (3): 771-6.
- Miranda MS, Cintra RG, Barros SBM, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31 (8): 1075-9.
- Bermejo P, Piñero E, Villar AM. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chem* 2008; 110(2): 436-45.
- Colla LM, Badiale EF, Costa JAV. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivated under different temperature and nitrogen regimes. *Braz Arch Biol Technol* 2007; 50 (1): 161-7.
- Brandão CT, Brandão RF. *Alimentação Alternativa*. Brasília: Centro de Pastoral Popular, Ed. Redentorista, 1996; 68p
- Vizeu VE, Feijó MBS, Campos RC. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura. *Ciênc Tecnol Aliment* 2005; 25 (2): 254-8.
- Kaminski TA, Silva LP, Bagetti M, Monego MA, Moura GB. Diferentes formulações de multimisturas sobre a resposta biológica em ratos. *Ciência Rural* 2008; 38 (8): 2327-33.
- Siqueira EMA, Arruda SF, Vargas RM, Souza EMT.  $\beta$ -Carotene from cassava (*Manihot esculenta Crantz*) leaves improves vitamin A status in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007; 146 (1-2): 235-40.
- Brandão CTT. *Alternativas alimentares*. Goiânia: CNBB/Pastoral da Criança 1988; 67p.
- Sacchet FS, Faria AF, Vasconcellos DGV, Souza-Soares LA, Badiale-Furlong E. Avaliação nutricional de multimisturas - efeito de um processo fermentativo. *Alim Nutr Araraquara*, 2006; 17 (4): 7-13.
- Farfan JA. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. *Cad Saúde Pública* 1998; 14 (1): 205-12.
- Ferreira HS, França AOS. Evolução do estado nutricional de crianças submetidas à internação hospitalar. *J Pediatr (Rio de Janeiro)* 2002; 78 (6): 491-6.
- Ferreira HS, Assunção ML, França AOS, Cardoso EPC, Moura FA. Efetividade da "multimistura" como suplemento de dietas deficientes em vitaminas e/ou minerais na recuperação ponderal de ratos submetidos à desnutrição pós-natal. *Rev Nutr* 2005; 18 (1): 63-74.
- Feddern V, Badiale-Furlong E, Soares LAS. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. *Ciênc Tecnol Aliment* 2007; 27 (4): 800-4.
- Furlong EB, Colla E, Bortolato DS, Baisch ALM, Souza-Soares LA. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor Rio Grande* 2003; 13: 105-14.
- Estrada JE, Bescós P, Villar Del Fresno AM. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *II Farmaco* 2001; 56 (5-7): 497-500.
- Altunkaya A, Becker EM, Gökmen V, Skibsted LH. Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chem* 2009; 115 (1): 163-8.
- Grossi de Sá MF, Chrispeels MJ. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amilases cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem Mol Biol* 1997; 27 (4): 271-81.

# Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento *in vitro* de bactérias veiculadas por alimentos

Effect of different preservatives concentrations on the *in vitro* growth of bacteria carried by food

RIALA6/1189

Ana Maria Queijeiro LÓPEZ<sup>1\*</sup>, Sheyla Ferreira LIMA-COELHO<sup>1</sup>, Giselda Macena LIRA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Campus A.C. Simões s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, AL, Brasil, CEP: 57072-970, e-mail: amql@qui.ufal.br

<sup>1</sup>Laboratório Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), UFAL.

<sup>2</sup>Faculdade de Nutrição (FANUT), UFAL.

Recebido: 07.11.2008 – Aceito para publicação: 10.04.2009

## RESUMO

Alguns micro-organismos causadores de infecções e veiculados por alimentos industrializados são removidos dos mesmos por tratamento térmico ou acidificação, enquanto outros são de difícil eliminação e requerem o uso de conservantes. Assim, acidificou-se meio de cultura TSA (Trypticase-Soja-Agar) com ácido cítrico (pH 3,5 e 5) e acrescentou-se ao mesmo quantidades específicas de metabissulfito de sódio (MBS), benzoato de sódio (BS) e sorbato de potássio (SP). Após inoculação com suspensões aquosas (100 µL = 10<sup>4</sup> células) de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, e incubação por 24-72 h, mensurou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos cultivos, visando obter a concentração mínima de cada conservante capaz de inibir (CIM) os isolados estudados *in vitro* e fornecer subsídios para sua utilização industrial em quantidades apropriadas. *B. cereus* foi o isolado mais suscetível a MBS, BS e SP (respectivamente 75, 275 e 750 mg.L<sup>-1</sup>), seguido por *E. coli* (respectivamente 75, 350 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>). Os isolados de *Salmonella* foram os mais resistentes, sendo seu crescimento completamente inibido por 1000 mg BS.L<sup>-1</sup>, mas apenas reduzido por 1250 mg SP.L<sup>-1</sup>. MBS inibiu totalmente *S. Typhimurium* a 75 mg.L<sup>-1</sup> e *S. Enteritidis* a 200 mg.L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave.** metabissulfito de sódio, benzoato de sódio, sorbato de potássio, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*.

## ABSTRACT

Some microorganisms that cause infections are served by processed foods, being removed from them by heat treatment or acidification, while others are difficult to remove and require the use of preservatives. Thus, in the culture medium TSA (trypticase-soya-agar, acidified with citric acid (pH 3.5 and 5.0)), it was added specific quantities of sodium metabisulphite (MBS), sodium benzoate (SB) and potassium sorbate (PS). After inoculation with aqueous suspensions (100 µL = 10<sup>4</sup> cells) from *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*, and incubation for 24-72 h, the number of colony-forming units (CFU) in the cultures was measured to obtain the minimum concentration of each preservative capable of inhibiting (MIC) *in vitro* the studied isolates, and provide subsidies for their industrial use in appropriate quantities. *B. cereus* was the isolate more susceptible to MBS, BS and PS (respectively 75, 275 and 750 mg.L<sup>-1</sup>), followed by *E. coli* (respectively 75, 350 and 1000 mg.L<sup>-1</sup>). Isolates of *Salmonella* were the most resistant, and their growth were completely inhibited by 1000 mg BS.L<sup>-1</sup>, but only reduced by 1250 mg PS.L<sup>-1</sup>. MBS completely inhibited *S. Typhimurium* to 75 mg.L<sup>-1</sup> and *S. Enteritidis* to 200 mg.L<sup>-1</sup>.

**Key words.** sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*.



## INTRODUÇÃO

O preparo ou armazenamento inadequado de alimentos pode levar consumidores a apresentarem desde pequenos desconfortos intestinais até doenças graves, devido a contaminação por micro-organismos patogênicos. Para a indústria, o problema é agravado, já que muitas vezes isso resulta em grandes perdas financeiras<sup>1</sup>, por comprometer seriamente a imagem do produto, e possíveis exportações<sup>1,2</sup>.

As bactérias patogênicas causam distúrbios não só pela sua capacidade invasiva, mas também pela produção de toxinas<sup>3,4</sup>. Algumas delas são facilmente removidas por tratamento térmico, outras são termorresistentes, como cianobactérias, tiobacilos, bacilos e clostrídios, que apresentam temperatura de crescimento em torno de 45°C, podendo a máxima ultrapassar os 70°C, sendo de difícil eliminação<sup>3</sup>.

Não se pode ter certeza que alimentos ácidos estejam livres de bactérias patogênicas, uma vez que algumas linhagens podem sobreviver em pH 2,5 por 2 h ou mais<sup>5,6</sup>. Na última década, várias surtos causados por *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Cryptosporidium* e vírus Norwalk foram associados ao consumo de suco de fruta não pasteurizado<sup>6,7,8,9</sup>. Mas sucos pasteurizados também são alvo de bactérias ácidotermófilas, como *Alicyclobacillus acitoterrestis*<sup>10</sup>.

Em estudos realizados por Iha et al.<sup>9</sup> no Estado de São Paulo, verificou-se a presença de coliformes a 45°C em suco de laranja pasteurizado. Sugai et al.<sup>11</sup> também constataram que, em decorrência do tempo de armazenamento, o número de células de bactérias mesofílicas e de fungos filamentosos ou leveduriformes aumentou em amostras de suco de laranja. Já no caso de leite tratado por temperatura extremamente elevada (UHT – ultra-high temperature), também foi demonstrada a contaminação por diferentes bactérias, inclusive *Bacillus cereus*<sup>12</sup>.

Assim, em alguns alimentos, como sucos, geleias, bolos, queijos, carnes, o uso de conservantes tem sido uma boa solução para inviabilizar a multiplicação bacteriana, seja agindo diretamente sobre elas ou potencializando o efeito de algum antibiótico. A enterocina EJ97 produzida por *Enterococcus faecalis* EJ97, por exemplo, tem efeito bactericida contra cepas INRA P53-2 de *B. macroides*/*B. maroccanus* isoladas de purê vegetal deteriorado. Essa atividade é menor em pH 5,0 e muito baixa em pH 9,0, mas potencializada por nitrito de sódio, benzoato de

sódio (BS), lactato de sódio e tri-polifosfato de sódio<sup>13</sup>. Alguns desses aditivos, contudo, são mais eficientes contra fungos, sendo pouco indicados para o controle bacteriano. Dentre as bactérias sensíveis estão os coliformes, as salmonelas, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*<sup>3</sup>.

Banks e Board<sup>4</sup> e Wibowo et al.<sup>5</sup> relataram que baixas concentrações de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), variando de 100 a 200 mg.L<sup>-1</sup>, têm efeito bacteriostático contra *Acetobacter* spp. e bactérias produtoras de ácido láctico em pH ácido, enquanto concentrações maiores desse produto têm efeito bactericida. O crescimento de salmonelas e outras enterobactérias foi inibido em molho inglês<sup>4</sup> quando utilizou-se 600 mg.L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub>, e o de bactérias lácticas foi inibido por concentrações de 1-10 mg.L<sup>-1</sup> desse mesmo produto em derivados de frutas<sup>5</sup> com pH ≤ 3,5.

Salienta-se que quando usados em quantidades excessivas, os conservantes podem ocasionar riscos à saúde humana, variando desde pequenas intolerâncias até casos de urticária, asma, renites, ou mesmo de choque anafiláticos<sup>14, 15, 16, 17, 18, 19</sup>.

A fim de fornecer subsídios para minimizar o uso de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, a ingestão imprópria dos mesmos pela população, determinou-se neste estudo a concentração mínima de metabisulfito de sódio (MBS), benzoato de sódio (BS) e sorbato de potássio (SP) necessária para inibir (CIM) *in vitro* o crescimento de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

### ■ Micro-organismos

As cepas de *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* foram isoladas de alimentos e gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Delgado da Silva, do Lab. de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Nutrição /UFAL. Esse material foi reinoculado em meio Agar Nutriente (AN) Oxoid®, previamente esterilizado, solidificado e inclinado em tubos, e após 48 h de incubação

a  $30 \pm 2$  °C no abrigo de luz, o mesmo foi armazenado a  $6 \pm 2$  °C para posterior utilização.

À medida que os experimentos foram realizados, as culturas mantidas sob refrigeração foram ativadas. Para isso, foram primeiramente repicadas no mesmo tipo de meio contido em placas de Petri esterilizadas, e incubadas por 24 h a  $30 \pm 2$  °C no escuro.

#### ■ Meio com conservante

Em frascos *Erlenmeyer* (500 mL), depositou-se a quantidade do meio TSA (Trypticase-Soja-Agar) indicada pelo fabricante (Oxoid®) para o preparo de 250 mL de meio, e acrescentou-se apenas 240 mL de água destilada estéril fervente, submetendo-se o material a aquecimento sob agitação para a completa homogeneização.

Em seguida, tais meios foram autoclavados ( $120^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 min) e, após resfriamento até  $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , mensurou-se o pH dos mesmos, ajustando-se este com ácido cítrico, para 3,5 e 5,0. Adicionou-se aos meios, então, em condições assépticas, 10 mL de solução aquosa de conservante, filtrada através de seringa acoplada a membrana Sartorius ( $\theta = 47$  mm;  $0,22 \mu\text{m}$ ), e completou-se assim o volume de cada um para 250 mL. Tal solução foi preparada dissolvendo-se o conservante em água destilada.

Os conservantes e respectivas concentrações finais nos meios com dois diferentes pHs foram os seguintes: **a) MBS:** 0, 10, 50, 75, 100, 200 e 300  $\text{mg.L}^{-1}$ ; **b) BS:** 0, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 750 e 1000  $\text{mg.L}^{-1}$ ; **c) SP:** 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250  $\text{mg.L}^{-1}$ . Após homogeneização do conservante no meio, o mesmo foi vertido em placas de Petri esterilizadas e aguardou-se sua solidificação para posterior inoculação (item anterior), e avaliação do efeito antimicrobiano conforme método descrito por Tosi et al.<sup>20</sup> As concentrações máximas testadas referem-se àquelas utilizadas na indústria e preconizadas na legislação.

Os experimentos seguiram delineamentos totalmente casualizados, com três réplicas por tratamento (micro-organismo X pH X cada concentração de conservante), totalizando 168 placas para cada ensaio do MBS, 216 placas para o ensaio do BS e 144 placas para o ensaio com SP, sendo cada um desses testes repetido em três ocasiões. Os dados foram submetidos à Análise de Variância através do teste F, e as médias dos tratamentos independentes comparadas através do teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). O programa utilizado para o

processamento e análise estatística foi o SAS (*Statistical Analysis System*), versão 9.1.<sup>21</sup>

#### ■ Inoculação e ensaios no meio com conservante

Culturas ativadas dos isolados em meio TSA (24 h) foram lavadas com 10 mL de água estéril, e cada suspensão de células foi recuperada individualmente em tubo estéril. Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão bacteriana foi adicionada a 9 mL de água estéril e novas diluições foram efetuadas ( $10^{-2}$  ou  $10^{-3}$ ), procedendo-se a contagem das células com auxílio de Câmara de Neubauer. A partir dessas contagens, efetuou-se uma diluição final de cada suspensão dos micro-organismos para  $10^5$  células.  $\text{mL}^{-1}$ , coletando-se das mesmas 100  $\mu\text{L}$  ( $10^4$  células) para inoculação nas placas contendo TSA (pH 3,5 e 5,0) com conservante. Esse inóculo foi homogeneizado sobre a superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski, e as culturas foram incubadas a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24, 48 e 72 h, no abrigo da luz. O controle de cada ensaio correspondeu ao meio TSA (pH 3,5 e 5,0) sem conservante (concentração  $0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), também inoculado.

A cada intervalo de tempo, efetuou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) das culturas. Quando esse número ultrapassou 270 colônias, foi descrito como abundante (Ab).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há vários relatos de sobrevivência de bactérias em pH ácido, principalmente para *E. coli*<sup>7</sup> e *Salmonella* sp. em suco de maçã (pH 3,0 - 4,0)<sup>6</sup>, porém, este último não tem sido bem descrito em meio de cultura. No presente estudo, entretanto, não foi observado desenvolvimento de qualquer dos isolados em meio com pH 3,5, contendo este ou não conservante, mesmo após 30 dias de incubação.

Com relação aos meios onde o pH foi corrigido para 5,0, os resultados constam nas Tabelas 1-4.

No caso de *E. coli* (Tabela 1), *B. cereus* (Tabela 2) e *S. Typhimurium* (Tabela 3), verificou-se que o MBS foi o conservante que apresentou a menor CIM ( $75 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mesmo após 72 h de incubação. *S. Enteritidis* (Tabela 4), entretanto, foi mais tolerante a tal produto, requerendo pelo menos  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  do mesmo para ser totalmente inibida.

Brenan et al.<sup>22</sup> demonstraram que a CIM de MBS frente a uma cepa Gram negativa de *Pseudomonadaceae* presente em cogumelos fatiados para conserva foi de  $2000 \text{ mg.L}^{-1}$  *in vitro*, isto é, quase 27 vezes maior do que a requerida para inibir o isolado de *E. coli* aqui estudado.

Banks e Board<sup>4</sup>, em estudos envolvendo a preservação de salsichas, demonstraram que as bactérias mais sensíveis a MBS foram oito sorovares de *Salmonella*, inibidos em concentrações de 15-109 mg.L<sup>-1</sup>, seguidos por *E. coli*, inibida por concentrações de 50-195 mg.L<sup>-1</sup>, *Citrobacter freundii* (65-136 mg.L<sup>-1</sup>), *Yersinia enterocolitica* (67-98 mg.L<sup>-1</sup>), *Enterobacter agglomerans* (83-142 mg.L<sup>-1</sup>), *Serratia marcescens* (190-241 mg.L<sup>-1</sup>) e *Hafnia alvei* (200-241 mg.L<sup>-1</sup>). Em estudos de Frank e Patel<sup>23</sup>, constatou-se que concentrações de 512 e 1024 mg.L<sup>-1</sup> de MBS exibem atividade bactericida respectivamente contra isolados planctônicos das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*/ *S. lugdunensis* e *S. epidermidis*. A concentração de 720

mg.L<sup>-1</sup> desse conservante inibiu o crescimento celular dessas três espécies em biofilme em formação, porém, biofilmes já estabelecidos de *S. aureus*/ *S. lugdunensis*, tratados com MBS por 24 h, sofreram apenas uma redução de 1,5 log<sub>10</sub> na contagem de células viáveis. A partir desses resultados com espécies de *Staphylococcus in vitro*, os autores sugeriram o uso de MBS como uma estratégia para inibir a colonização estafilocócica de cateteres, prevenindo as infecções relacionadas ao uso desses. As ações mais prováveis para inibição por sulfitos incluem o rompimento da membrana plasmática, a inativação da replicação do ácido desoxiribonucléico e da síntese ou ação de proteínas/enzimas citoplasmáticas ou ligadas à

**Tabela 1.** Contagem de *Escherichia coli* (Unidades Formadoras de Colônias mL<sup>-1</sup>) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de UFC.mL <sup>-1</sup> Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	170,55 ± 46,40 <sup>b</sup>	2593,33 ± 102,50 <sup>b</sup>	Ab**a
MBS- 50	70,00 ± 30,80 <sup>cd</sup>	275,66 ± 85,90 <sup>c</sup>	342,20 ± 79,80 <sup>c</sup>
MBS- 75	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
MBS- 100	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
MBS- 200	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
MBS- 300	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 250	190,00 ± 48,90 <sup>b</sup>	Ab**a	Ab**a
BS- 275	53,33 ± 28,70 <sup>d</sup>	718,90 ± 108,20 <sup>d</sup>	1056,70 ± 89,30 <sup>b</sup>
BS- 300	7,80 ± 6,66 <sup>e</sup>	84,40 ± 28,30 <sup>e</sup>	107,80 ± 74,10 <sup>d</sup>
BS- 350	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 400	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 500	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 750	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 1000	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
SP- 250	201,11 ± 56,66 <sup>b</sup>	Ab**a	Ab**a
SP- 500	153,33 ± 39,70 <sup>bc</sup>	Ab**a	Ab**a
SP- 750	91,11 ± 26,20 <sup>c</sup>	802,20 ± 60,80 <sup>c</sup>	1094,40 ± 102,00 <sup>b</sup>
SP- 1000	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
SP- 1250	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>

\* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; \*\* Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05), pelo teste de Tukey.

membrana, ou, ainda, a reação com componentes individuais do metabolismo dos micro-organismos.

Por outro lado, a menor concentração de BS eficaz contra a bactéria Gram negativa *E. coli* (Tabela 1) foi de 350 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que o isolado Gram positivo de *B. cereus* (Tabela 2) foi inibido por concentrações de BS superiores a 250 mg L<sup>-1</sup>. No caso do SP, foi necessária uma concentração mínima de 1000 mg.L<sup>-1</sup> do mesmo para inibição do crescimento da cepa de *E. coli* (Tabela 1), enquanto que nem mesmo uma concentração de 1250 mg.L<sup>-1</sup> desse produto foi suficiente para inibição do crescimento dos isolados de *Salmonella* (Tabelas 3 e 4). O crescimento *in vitro* de *B. cereus* (Tabela 2),

entretanto, foi inibido por concentração de SP superior a 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Ostergaard<sup>24</sup> verificou que as bactérias Gram negativas *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema socranskii*, isoladas de placas dentais, só foram inibidas *in vitro* por BS quando se utilizou cerca de 3000 mg. L<sup>-1</sup> do mesmo. O mesmo autor verificou que nenhuma bactéria Gram positiva dessas placas foi inibida por BS (CIM > 15000 mg.L<sup>-1</sup>).

Karabay e Sahin<sup>25</sup> verificaram que 36 isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e 29 isolados de *S. aureus* sensíveis a esse antibiótico (MSSA), todos clinicamente relevantes, foram inibidos *in vitro* por

**Tabela 2.** Contagem de *Bacillus cereus* (Unidades Formadoras de Colônias mL<sup>-1</sup>) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de UFC.mL <sup>-1</sup> Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	128,90 ± 27,10 <sup>b</sup>	Ab**a	Ab**a
MBS- 50	37,70 ± 8,30 <sup>c</sup>	2474,40 ± 103,80 <sup>b</sup>	515,50 ± 70,60 <sup>b</sup>
MBS- 75	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
MBS- 100	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
MBS- 200	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
MBS- 300	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 250	0 <sup>e</sup>	21,10 ± 7,80 <sup>d</sup>	44,44 ± 15,80 <sup>c</sup>
BS- 275	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 300	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 350	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 400	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 500	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 750	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
BS- 1000	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
SP- 250	20,00 ± 7,10 <sup>d</sup>	73,33 ± 31,66 <sup>c</sup>	73,33 ± 33,20 <sup>c</sup>
SP- 500	0 <sup>e</sup>	7,80 ± 6,66 <sup>d</sup>	10,00 ± 8,70 <sup>d</sup>
SP- 750	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
SP- 1000	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
SP- 1250	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>

\* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; \*\* Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05), pelo teste de Tukey.

**Tabela 3.** Contagem de *Salmonella Typhimurium* (Unidades Formadoras de Colônias mL<sup>-1</sup>) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de UFC.mL <sup>-1</sup> Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	70,00 ± 30,80 <sup>d</sup>	Ab**a	Ab**a
MBS- 50	35,60 ± 20,10 <sup>e</sup>	343,33 ± 62,66 <sup>d</sup>	1456,70 ± 97,50 <sup>d</sup>
MBS- 75	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
MBS- 100	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
MBS- 200	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
MBS- 300	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
BS- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 275	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 300	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 350	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 400	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 500	342,20 ± 35,70 <sup>b</sup>	2273,30 ± 106,20 <sup>b</sup>	Ab**a
BS- 750	47,80 ± 19,20 <sup>de</sup>	106,70 ± 42,70 <sup>e</sup>	1898,90 ± 99,20 <sup>c</sup>
BS- 1000	0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
SP- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 500	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 750	182,20 ± 37,30 <sup>c</sup>	1767,80 ± 82,90 <sup>c</sup>	2326,60 ± 142,90 <sup>b</sup>
SP- 1000	57,80 ± 27,80 <sup>de</sup>	473,30 ± 65,70 <sup>d</sup>	817,80 ± 61,20 <sup>e</sup>
SP- 1250	0 <sup>f</sup>	74,40 ± 15,80 <sup>e</sup>	95,60 ± 31,70 <sup>f</sup>

\* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; \*\* Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05), pelo teste de Tukey.

BS a uma concentração mínima de 32 mg.L<sup>-1</sup>. Karabay et al.<sup>26</sup> também verificaram o efeito do BS contra *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, constatando que 90% das células foram inibidas *in vitro* por concentrações respectivamente de 64 mg.L<sup>-1</sup> e 32 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto a morte de 90% dessas populações exigiu o dobro dessas concentrações de BS.

Por outro lado, já foi demonstrado que outras espécies de bactérias Gram positivas, inclusive *Bacillus*, são capazes de degradar o BS<sup>24, 27, 28</sup>, assim como algumas bactérias lácticas em fermentação de azeitona preta apresentam inclusive crescimento estimulado na presença de concentrações de pelo menos 500 mg.L<sup>-1</sup> de SP<sup>29</sup>.

Crawford<sup>27</sup>, analisando bactérias esporuladas em amostras de solo, verificou que das 12 cepas de *Bacillus* examinadas, 9 eram *B. brevis*, duas eram *B. sphaericus* e uma correspondia a *B. megaterium*, sendo que todas degradavam *m*-hidroxibenzoato através da mesma via (Figura 1). Essa degradação começa com a hidroxilação da molécula a 2,5-di-hidroxibenzoato (gentisato), o qual é oxidado pela gentisato 1,2-dioxigenase, gerando maleil-piruvato. Este é hidrolizado sem prévia isomerização *cis, cis* a *cis, trans*, rendendo piruvato e ácido maléico. Da mesma forma, a cepa termofílica de *B. stearothermophilus* PK1 utiliza benzoato, 3-hidroxibenzoato e gentisato como única fonte de



**Tabela 4.** Contagem de *Salmonella Enteritidis* (Unidades Formadoras de Colônias mL<sup>-1</sup>) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de UFC.mL <sup>-1</sup> Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	273,33 ± 31,66 <sup>b</sup>	Ab**a	Ab**a
MBS- 50	187,80 ± 38,00 <sup>c</sup>	Ab**a	Ab**a
MBS- 75	108,90 ± 29,30 <sup>e</sup>	Ab**a	Ab**a
MBS- 100	23,30 ± 11,70 <sup>fg</sup>	848,90 ± 53,00 <sup>c</sup>	1268,90 ± 80,10 <sup>b</sup>
MBS- 200	0 <sup>h</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>f</sup>
MBS- 300	0 <sup>h</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>f</sup>
BS- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 275	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 300	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 350	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 400	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 500	211,10 ± 49,10 <sup>bc</sup>	2573,30 ± 88,80 <sup>b</sup>	Ab**a
BS- 750	0 <sup>e</sup>	73,30 ± 13,30 <sup>e</sup>	241,10 ± 49,10 <sup>d</sup>
BS- 1000	0 <sup>h</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>f</sup>
SP- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 500	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 750	168,90 ± 28,90 <sup>d</sup>	2654,40 ± 95,40 <sup>b</sup>	Ab**a
SP- 1000	30,00 ± 13,30 <sup>f</sup>	571,10 ± 69,00 <sup>d</sup>	1057,80 ± 71,60 <sup>c</sup>
SP- 1250	12,20 ± 9,70 <sup>g</sup>	21,10 ± 7,80 <sup>f</sup>	24,40 ± 11,30 <sup>e</sup>

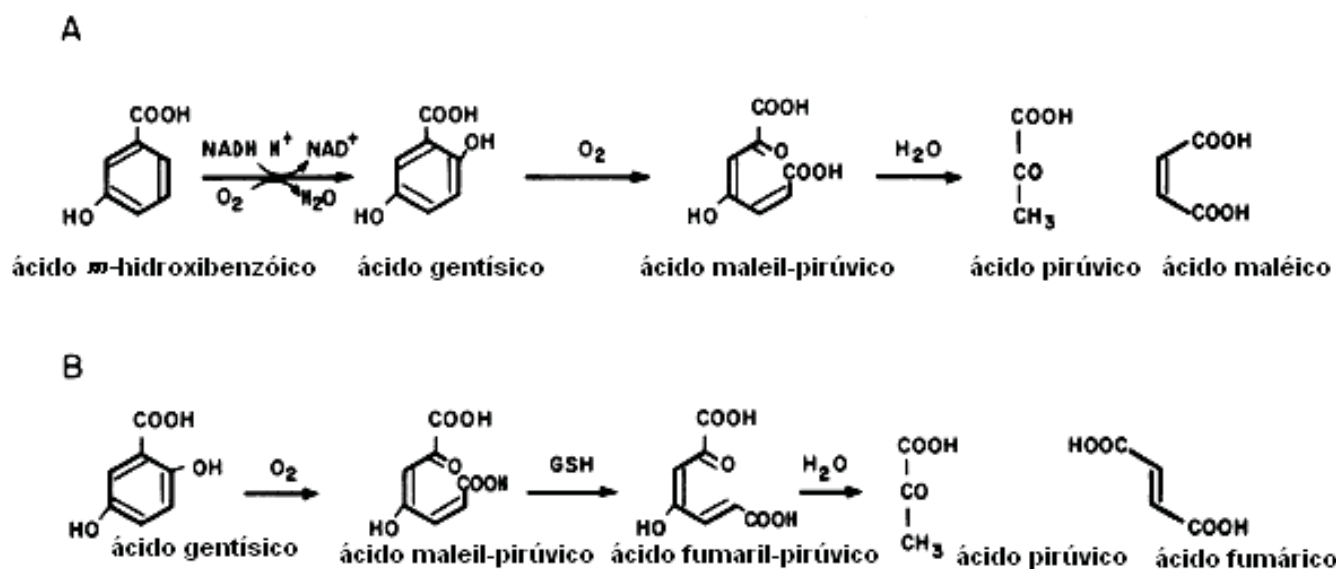
\* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; \*\* Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

carbono e energia, embora não seja capaz de degradar 2- e 4-hidroxibenzoato, 2,3- e 3,4-di-hidroxibenzoato e catecol. A degradação do benzoato ocorre via benzoil-coenzima A (benzoil-CoA) e gentisato, sendo que a enzima induzível benzoil-CoA ligase converte benzoato (mas não o 3-hidroxibenzoato) ao tioéster (coenzima-A). A gentisato 1,2-dioxigenase desse micro-organismo é extremamente dependente da adição de Fe<sup>2+</sup>, sendo inibida na ausência deste ou na presença de agentes quelantes de metais, justificando a importância do Fe<sup>2+</sup> para a catálise em questão<sup>28</sup>.

O benzoato, portanto, é utilizado para inibir a oxidação do piruvato em nível do acetato (Acetil-

Coa), fazendo com que *Bacillus* sp. se utilize da via fermentativa produzindo ácido láctico, diminuindo sua eficiência energética e velocidade de reprodução. No presente estudo, o crescimento de *B. cereus* diminuiu de acordo com o aumento da concentração de benzoato até ser totalmente inibido.

A concentração de conservante necessária para inibir totalmente o crescimento das espécies bacterianas estudadas foi inferior à utilizada por algumas indústrias de alimentos que, em geral, utilizam a quantidade máxima permitida pela legislação vigente<sup>31,32,33,34</sup> sem realizar ensaios que minimizem a concentração de aditivos inseridos em seus produtos. Conforme essa legislação,



**Figura 1.** Degradação de gentisato (2,5-di-hidroxibenzoato). A) via de degradação do *m*-hidroxibenzoato por espécies de *Bacillus*, de acordo com Crawford<sup>27</sup>. B) via de degradação do gentisato, conforme descrito originalmente por Lack<sup>30</sup>

os valores máximos de MBS variam até 600 mg.L<sup>-1</sup>, dependendo do alimento em que deve ser adicionado. Já o SP tem seu limite máximo fixado em 2000 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto o BS chega a atingir 3000 mg.L<sup>-1</sup>, como no caso de leite de coco pasteurizado. Wind e Restaino<sup>32</sup> mostraram que o SP em concentrações de 3000 mg.L<sup>-1</sup> permitiu o crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* em maioneses. Concentrações mais elevadas de conservantes não podem ser aplicadas, devido a limitações legais e alterações do sabor do produto. Tais estudos indicam que a utilização de ingredientes de elevada qualidade em termos microbiológicos e o fabrico consoante às normas de boas práticas de higiene são critérios fundamentais para evitar a proliferação de leveduras de contaminação.

É importante atentar para esse fato, visando reduzir os riscos à saúde humana, não somente no sentido de prevenir a presença de bactérias patogênicas, mas também de evitar possíveis casos de alergias, dentre outros males causados pelo uso excessivo de conservantes pela indústria de alimentos. Para tanto, seria ideal o estabelecimento de procedimentos de rotina para testar, em seus laboratórios de controle de qualidade, concentrações menores do que as máximas estabelecidas pela legislação, contra micro-organismos indicadores (coliformes e outros mais específicos para cada alimento).

## CONCLUSÃO

Verificou-se que, para os micro-organismos aqui estudados, o metabisulfito de sódio apresentou uma maior eficiência em termos de inibição de crescimento, em menores concentrações que os demais conservantes testados *in vitro*, e em menores concentrações do que o comumente utilizado pelas indústrias. Dentre os micro-organismos testados, o isolado de *Bacillus cereus* foi o mais suscetível aos conservantes estudados, apresentando menores taxas de desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

1. Jay JM. Microbiologia dos Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre; Artmed; 2005.
2. Góes LMNB, Mendes PP, Mendes ES, Ribeiro CMF, Silva RPP. Uso do metabisulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Acta Sci Biol Sci*. 2006; 28(2): 153-7.
3. Franco DBGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos, 2ª ed. São Paulo; Atheneu; 2005.
4. Banks JG, Board RG. Comparison of methods for examination of free and bound sulphur dioxide in stored British fresh sausage. *J Sci Food & Agric*. 1982; 33: 197-203.
5. Wibowo D, Eschenbruch R, Davis CR, Fleet GH, Lee TH. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine - A review. *Am J Enol Vitic*. 1985; 36: 302.

6. De Jonge R, Takumi K, Ritmeester WS, Leusden FM. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. *J Appl Microbiol*. 2003; 94: 555–60.
7. Ghenghesh KS, Belhaj K, El-Amin WB, El-Nefathi SE, Zalmum A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli–Libya. *Food Contr*. 2005; 16: 855–8.
8. Gawande PV, Bhagwat AA. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp. *J Appl Microbiol*. 2002; 93: 689–96.
9. Iha MH, Fávoro RMD, Okada MM, Prado SPT, Martins AMB, Oliveira MA, Febronio LHP, Garrido NS. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2000; 9: 39-44.
10. Wawase KYF, Coelho GLV, Luchese RH. Uso de conservadores ácido benzóico e benzoato de sódio no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja. *Rev Ciênc Vida*. 2008; 28(2): 53-62.
11. Sugai AY, Shigeoka DS, Badolato GG, Tadini CC. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002; 22(3): 233-8.
12. Vidal-Martins AMC, Rossi-Jr OD, Rezende-Lago NC. Microorganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005; 57(3): 396-400.
13. García MT, Lucas R, Abriouel H, Omar NB, Pérez R, Grande MJ, Martínez-Cañhamero M, Gálvez A. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against “*Bacillus macroides*/*Bacillus maroccanus*” isolated from zucchini purée. *J Appl Microbiol*. 2004; 97: 731-7.
14. Teles Fº PA. Asma Brônquica – tipos: asma por sulfitos. Disponível on-line em: [http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos\\_de\\_asma\\_asma\\_sulfitos.html](http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html).
15. Taylor SL. Why sulfite alternatives? *Food Technol*. 1993; 47 (10): 14.
16. Taylor SL, Bush RK. Sulfites as food ingredients. *Food Tech*. 1986; 40 (6): 47-52.
17. Taylor SL, Bush RK. Sulfites as food ingredients. *Food Tech*. 1987; 39 (11): 532-6.
18. Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*. 2002; 13:117–23.
19. World Health Organization (WHO). Benzoic acid and sodium benzoate. *Conc Int Chem Assess Geneva*. 2000; Doc 26.
20. Tosi EA, Ré E, Ortega ME, Cazzoli AF. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem*. 2007; 104(3): 1025-9.
21. Statistical analysis system - SAS. SAS user’s guide: statistics [CD-ROM], version 9.1. 6ª ed. Cary: 2003.
22. Brennan M, Le Port G, Pulvirenti A, Gormley R. The effect of sodium metabisulphite on the whiteness and keeping quality of sliced mushrooms. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technol*. 1999; 32(7): 460-3.
23. Frank K, Patel R. Activity of sodium metabisulphite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. *Diag Microb & Infec Dis*. 2007; 57(4): 355-9.
24. Ostergaard E. Evaluation of the antimicrobial effects of sodium benzoate and dichlorobenzyl alcohol against dental plaque microorganisms: An *in vitro* study. *Acta Odontol Scand*. 1994; 52(6): 335-45.
25. Karabay O, Sahin I. *In vitro* activity of sodium-benzoate against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *West Indian Med J*. 2005; 54(2): 107-9.
26. Karabay O, Kocoglu E, Ince N, Sahan T, Ozdemir D. *In vitro* activity of sodium-benzoate against clinically relevant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *The J Microb*. 2006; 44(1): 129-31.
27. Crawford RL. Degradation of 3-hydroxybenzoate by bacteria of the genus *Bacillus*. *Appl Microb*. 1975; 30(3): 439-44.
28. Kiemer P, Tshisuaka B, Fetzner S, Lingens F. Degradation of benzoate via benzoyl-coenzyme A and gentisate by *Bacillus stearothermophilus* PK1, and purification of gentisate 1,2-dioxygenase. *Biol & Fert of Soils*. 1996; 23(3):307-13.
29. Turanta F, Göksungur Y, Dinçer AH, ÜnütürkA, Güvenç U, Zorlu NEE. Effect of potassium sorbate/sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives. *J Sci Food & Agric*. 1999; 79 (9):1197-202.
30. Lack L. The enzymic oxidation of gentisic acid. *Biochem Biophys Acta*. 1959; 34: 117-23.
31. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 3 de Alimentos: Gelados comestíveis”, que consta como Anexo. *Diário Oficial da União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
32. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 13 de Alimentos: Molhos e Condimentos”, que consta como Anexo. *Diário Oficial da União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
33. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16.2: Bebidas Não Alcoólicas, Subcategoria 16.2.2: Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas”, que consta como Anexo. *Diário Oficial da União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
34. Brasil. Resolução RDC nº 217, de 29 de julho de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova a Extensão de Uso do Aditivo Dióxido de Enxofre e seus Sais de Cálcio, Sódio e Potássio na Função Conservador em Polpas e Purês de Vegetais de acordo com o Anexo. *Diário Oficial da União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 1º ago. 2005.
35. Wind CE, Restaino L. Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *J Food Prot*. 1995; 58(11): 1257-9.

## Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação

Antioxidant activity of lemon (*Citrus limon*) seeds extract with addition of soybean oil under thermoxidation process

RIALA6/1190

Débora Maria Moreno LUZIA<sup>1</sup>, Neuza JORGE<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil, e-mail: njorge@ibilce.unesp.br

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Recebido: 23.09.2008 – Aceito para publicação: 06.03.2009

### RESUMO

No presente trabalho foram avaliados a ação antioxidante do extrato de sementes de limão adicionado ao óleo de soja, submetido à termoxidação, e o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ). Desta forma, foram preparados os seguintes tratamentos: Controle, TBHQ (50 mg.kg<sup>-1</sup>), ESL (2.400 mg.kg<sup>-1</sup> Extrato de Sementes de Limão), Mistura 1 (ESL + 50 mg.kg<sup>-1</sup> TBHQ) e Mistura 2 (ESL + 25 mg.kg<sup>-1</sup> TBHQ), que foram incubados a 180°C durante 20 horas. As amostras foram coletadas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15 e 20 horas e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram estatisticamente estudadas pela análise de variância e teste de Tukey a 5% de nível de significância, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente randômico. Verificou-se que o ESL e as Misturas 1 e 2 apresentaram capacidade de retardar a oxidação lipídica, quando adicionados ao óleo de soja. Entretanto, as Misturas 1 e 2 apresentaram um maior poder antioxidante, o que comprova o efeito sinérgico dos antioxidantes em estudo.

**Palavras-chave.** extrato de sementes de limão, índice de peróxidos, dienos conjugados, termoxidação.

### ABSTRACT

The present study evaluated the antioxidant activity of lemon seed extract added to soybean oil, submitted to thermoxidation, and its synergistic effect with synthetic antioxidant tertiary-butylhydroquinone (TBHQ). For carrying out the proposed investigation, the following treatments were prepared: Control, TBHQ (50 mg.kg<sup>-1</sup>), LSE (2.400 mg.kg<sup>-1</sup> Lemon Seed Extract), Mixture 1 (LSE + 50 mg.kg<sup>-1</sup> TBHQ), and Mixture 2 (LSE + 25 mg.kg<sup>-1</sup> TBHQ). These preparations were incubated at 80°C for 20 hours, and samples were collected at time intervals of 0, 5, 10, 15, and 20 hours which were analyzed in regarding to peroxide indices and conjugated dienes. The obtained results from the analytical determinations were statistically analyzed as for variance analysis and Tukey test at 5% significance level, at factorial scheme, using completely randomized experimental delineation. The LSE, Mixtures 1 and 2 presented the ability in delaying the lipid oxidation, when added to the soybean oil. However, Mixtures 1 and 2 presented a highest antioxidant ability, and thus proved the synergistic effect of these investigated antioxidants.

**Key words.** lemon seeds extract, peroxide index, conjugated dienes, thermoxidation.

## INTRODUÇÃO

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional<sup>1</sup>.

O Brasil é responsável por cerca de 28% da produção mundial de soja, com a safra de 2006 estimada ao redor de 57 milhões de toneladas. O país é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo de soja<sup>2</sup>.

O óleo de soja, um dos mais saudáveis em seu segmento, contém em sua composição o maior teor de ácidos graxos poli-insaturados, sendo mais abundantes os ácidos linoleico e linolênico, que são essenciais ao organismo e, como não são sintetizados pelo corpo humano, devem ser ingeridos através dos alimentos<sup>3</sup>.

O retardo ou a prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração no processo de aquecimento de óleos vegetais, pode ser realizado pela adição de antioxidantes, que mantêm a qualidade do alimento<sup>4</sup>. No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Sendo assim, pesquisas são realizadas em busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, podendo atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos.

O TBHQ é considerado o melhor antioxidante sintético para óleos sob temperaturas elevadas, pois resiste ao aquecimento. Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade desse antioxidante apresentar efeito carcinogênico em experimentos com animais<sup>5</sup>. Por esse motivo, o uso de antioxidantes sintéticos é restringido em vários países, visto que existe a possibilidade de terem efeitos indesejáveis para a saúde humana<sup>6</sup>.

O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia<sup>7</sup>. No Brasil, o uso de antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200 mg.kg<sup>-1</sup> para BHA e TBHQ e 100 mg.kg<sup>-1</sup> para BHT como concentrações máximas permitidas<sup>8</sup>.

Por várias décadas os pesquisadores têm demonstrado um grande interesse em identificar e isolar antioxidantes naturais, devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos<sup>9</sup>. Dentre as inúmeras fontes de antioxidantes naturais estão incluídos cereais<sup>9</sup>, sementes e casca de frutas cítricas<sup>10</sup>, cogumelos<sup>11</sup>, ervas e especiarias<sup>12</sup> e plantas medicinais<sup>13</sup>.

O limão é uma fruta cítrica rica em vitaminas, principalmente vitamina C, fibras e potássio<sup>14</sup>. É extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra. É utilizado para a fabricação de sucos naturais e concentrado, além de ser tecnologicamente usado como flavorizante em alimentos, devido ao óleo essencial presente em sua casca<sup>15</sup>.

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutos cítricos e o maior exportador de sucos cítricos. A produção brasileira de limão está localizada no Estado de São Paulo, sendo o primeiro produtor destes frutos, representando 81,3% da produção, seguido pelo Rio de Janeiro e Bahia com 3,9 e 2,7%, respectivamente<sup>16</sup>.

Grande parte do resíduo sólido das sementes de limão é uma fonte inexplorada de óleo que pode alcançar 55% de rendimento<sup>17</sup>. Este óleo pode ser aproveitado pela indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. As frutas cítricas são conhecidas por conterem antioxidantes naturais na polpa, nas sementes e na casca<sup>10</sup>.

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de substituí-los por antioxidantes naturais ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos<sup>18</sup>. Além disso, estudos epidemiológicos sugerem que antioxidantes naturais podem ser benéficos ao organismo humano, prevenindo doenças<sup>7</sup>, porém faz-se necessário submeter estes antioxidantes a testes toxicológicos.

Considerando o elevado consumo de alimentos fritos, o interesse em reduzir as alterações que ocorrem no óleo durante o processo de aquecimento e o estímulo à substituição ou diminuição do uso de antioxidantes sintéticos, torna-se necessário estudar a ação antioxidante do extrato de sementes de limão adicionado ao óleo de soja sob termoxidação e também o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético TBHQ, atualmente utilizado pelas indústrias de alimentos com a finalidade de retardar as alterações oxidativas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ■ Sementes de limão

As frutas maduras, variedade galego, foram provenientes de uma plantação na região de Itajobi/SP, colhidas em Janeiro de 2007. Os limões foram cortados pela metade e



as sementes retiradas manualmente e, em seguida, lavadas ligeiramente com água destilada para remover restos de polpas e açúcares solúveis provenientes das frutas. As sementes foram secas em estufa, com circulação de ar forçada, a 45°C por 24 horas para redução do teor de umidade abaixo de 10%. Depois, foram armazenadas em recipientes plásticos, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados, para análises posteriores.

#### ■ Óleo de soja

Para a realização do experimento foi utilizado óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico). Utilizaram-se embalagens contendo 900 mL de óleo de soja, processado pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia-MG.

#### ■ Antioxidantes

O antioxidante sintético utilizado foi o terc-butilhidroquinona (TBHQ), apresentado na forma em pó, fornecido pela empresa Danisco S/A.

O extrato metanólico de sementes de limão foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Pereira<sup>10</sup>. As sementes de limão desidratadas e trituradas (10 g) foram mantidas sob agitação permanente com metanol (100 mL) à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), durante seis horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, por dez minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes da extração foram combinados. Em seguida, procedeu-se à remoção do solvente utilizado para a obtenção do extrato metanólico, sob pressão reduzida a 40°C. O extrato seco foi pesado e ressuspense em metanol, obtendo-se solução-estoque contendo um grama de extrato metanólico para cada dez gramas de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

#### ■ Ensaio experimental

Foram submetidos à termoxidação os seguintes tratamentos, conduzidos com duas repetições: i) óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico (Controle), ii) óleo de soja com adição de 2.400 mg.kg<sup>-1</sup> de extrato de sementes de limão (ESL), iii) óleo de soja com adição de 50 mg.kg<sup>-1</sup> de TBHQ (TBHQ), iv) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg.kg<sup>-1</sup> de extrato de sementes de limão e

50 mg.kg<sup>-1</sup> de TBHQ (Mistura 1) e v) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg.kg<sup>-1</sup> de extrato de sementes de limão e 25 mg.kg<sup>-1</sup> de TBHQ (Mistura 2).

Os tratamentos foram realizados em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4 cm<sup>-1</sup>. A temperatura foi monitorada a  $180 \pm 5^\circ\text{C}$ .

O experimento foi conduzido de modo descontínuo, sendo realizadas 10 horas de aquecimento por dia, cujas amostras foram tomadas nos períodos de tempo 0, 5, 10, 15 e 20 horas. As amostras, nos diferentes intervalos de tempo, foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18°C até o momento das análises.

#### ■ Métodos

Com o objetivo de determinar as alterações oxidativas primárias, utilizaram-se análises de peróxidos e dienos conjugados para a avaliação das amostras obtidas durante a termoxidação.

#### ■ Índice de peróxidos

Denomina-se índice de peróxidos a quantidade de oxigênio ativo, calculada em miliequivalentes, contida em um quilograma de óleo, medida a partir do iodo liberado do iodeto de potássio pelos peróxidos presentes no óleo. Esse índice foi determinado segundo a norma da AOCS Cd 8-53<sup>19</sup>.

#### ■ Dienos conjugados

Este método determina dienos conjugados presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados, após leitura da absorbância a 233 nm. A determinação de dienos conjugados foi efetuada de acordo com o método oficial AOCS Ti 1a-64<sup>19</sup>.

#### ■ Delineamento experimental

Para as amostras submetidas à termoxidação foram considerados os seguintes fatores: Tratamentos (Controle, ESL, TBHQ, Mistura 1 e Mistura 2) e Tempos de aquecimento (0, 5, 10, 15 e 20 horas).

Os resultados obtidos para índice de peróxidos e dienos conjugados, em duas repetições, foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos fatores sobre a alteração das amostras de óleos submetidos à termoxidação. O experimento foi realizado em

esquema fatorial 5 x 5, no delineamento inteiramente casualizado<sup>20</sup>. A análise de variância e o teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0<sup>21</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ■ Índice de peróxidos

A Tabela 1 apresenta as médias de índice de peróxidos e dienos conjugados para a interação tratamentos x tempos de aquecimento. Observa-se que houve um acréscimo no índice de peróxidos para os tratamentos até o tempo de 20 horas de termoxidação, havendo diferença significativa entre os tempos de aquecimento.

Nota-se que no tempo inicial o ESL apresentou maior ação protetora ao óleo, seguido da Mistura 2 e TBHQ. De 5 até 15 horas de aquecimento, os teores de peróxidos dos tratamentos ESL, Mistura 1 e Mistura 2 não diferiram significativamente, apresentando-se mais eficientes na proteção do óleo, com relação à formação de peróxidos.

Os tratamentos ESL, TBHQ, Misturas 1 e 2 reduziram a formação de peróxidos em 47%, 34% e 36%, respectivamente, às 15 horas a 180°C. Verifica-se que a adição do extrato metanólico de sementes de limão ao óleo de soja foi tão eficiente quanto as misturas de antioxidantes, contra a formação de peróxidos.

No final do processo os tratamentos estudados não diferiram estatisticamente do controle. Os peróxidos, por serem instáveis, são rapidamente formados e quebrados em compostos menores. Após 20 horas de aquecimento, encontram-se dentro da margem permitida pelas normas que regulamentam a adequação de óleo de soja refinado para consumo no Brasil, a Portaria 482/99-ANVISA, que estabelece o limite máximo de 10 meq.kg<sup>-1</sup> de óleo<sup>22</sup>.

Andreo<sup>23</sup> verificou que o TBHQ apresentou maior ação protetora ao óleo, seguido do extrato natural de gengibre e da mistura de extrato com TBHQ. Porém, estes tratamentos tiveram uma rápida perda da ação antioxidante a 180°C, mas o TBHQ foi o primeiro a perder sua eficiência contra a formação de peróxidos no óleo termoxidado.

**Tabela 1.** Médias de índice de peróxidos e dienos conjugados para a interação tratamentos x tempos de aquecimento

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
<b>Índice de peróxidos (meq.kg<sup>-1</sup>)</b>					
Controle	1,95 <sup>eA</sup>	5,45 <sup>dA</sup>	7,67 <sup>cA</sup>	8,87 <sup>bA</sup>	10,05 <sup>aA</sup>
ESL	1,65 <sup>eB</sup>	2,75 <sup>dC</sup>	3,67 <sup>cC</sup>	4,66 <sup>bC</sup>	10,05 <sup>aA</sup>
TBHQ	1,85 <sup>eAB</sup>	3,92 <sup>dB</sup>	4,75 <sup>cB</sup>	5,85 <sup>bB</sup>	10,08 <sup>aA</sup>
Mistura 1	1,90 <sup>eA</sup>	2,05 <sup>dC</sup>	3,61 <sup>cC</sup>	5,69 <sup>bC</sup>	10,19 <sup>aA</sup>
Mistura 2	1,76 <sup>eAB</sup>	2,90 <sup>dC</sup>	3,37 <sup>cC</sup>	5,66 <sup>bC</sup>	10,11 <sup>aA</sup>
<b>Dienos conjugados (%)</b>					
Controle	0,28 <sup>eA</sup>	0,75 <sup>dA</sup>	1,67 <sup>cA</sup>	2,19 <sup>bA</sup>	3,02 <sup>aA</sup>
ESL	0,27 <sup>eA</sup>	0,61 <sup>dAB</sup>	1,52 <sup>cA</sup>	1,84 <sup>bB</sup>	2,49 <sup>aB</sup>
TBHQ	0,24 <sup>eA</sup>	0,65 <sup>dAB</sup>	1,68 <sup>cA</sup>	2,24 <sup>bA</sup>	2,93 <sup>aA</sup>
Mistura 1	0,26 <sup>eA</sup>	0,52 <sup>dB</sup>	1,05 <sup>cB</sup>	1,54 <sup>bC</sup>	2,24 <sup>aC</sup>
Mistura 2	0,24 <sup>eA</sup>	0,49 <sup>dB</sup>	1,11 <sup>cB</sup>	1,52 <sup>bC</sup>	2,19 <sup>aC</sup>

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg.kg<sup>-1</sup>); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg<sup>-1</sup>); Mistura 1: ESL (2.400 mg.kg<sup>-1</sup>) + TBHQ (50 mg.kg<sup>-1</sup>); Mistura 2: ESL (2.400 mg.kg<sup>-1</sup>) + TBHQ (25 mg.kg<sup>-1</sup>).

a, b... (linha) - médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

A, B... (coluna) - médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### ■ Dienos conjugados

O acompanhamento dos espectros de absorção na faixa do ultravioleta das amostras de óleo fornecem uma boa indicação das alterações que ocorrem durante o processo oxidativo. Por serem instáveis, os peróxidos são rapidamente formados e quebrados em compostos menores, porém, os dienos conjugados que se formam concomitantemente permanecem no óleo aquecido<sup>24</sup>.

De acordo com a Tabela 1, observa-se que houve um acréscimo nos valores de dienos conjugados para todos os tratamentos, com o aumento do tempo de aquecimento.

Verifica-se que no início (0 hora) não houve diferença de dienos conjugados nos tratamentos utilizados. Esta diferença começou a ser detectada estatisticamente apenas a partir de 5 horas. Observa-se no tempo de aquecimento de 10 horas, que os tratamentos ESL e TBHQ não foram eficientes contra a formação de dienos conjugados, pois não diferiram do controle.

Os tratamentos ESL, Mistura 1 e Mistura 2 demonstraram desempenhos estatisticamente diferentes ao controle a ao TBHQ somente a partir de 15 horas de termoxidação. No final do processo, a atividade antioxidante das Misturas 1 e 2, destacaram-se, apresentando menores níveis de dienos conjugados que o ESL. O TBHQ não diferiu do controle em todos os tempos de aquecimento.

Ao final do processo, as Misturas 1 e 2 foram capazes de reduzir em 26 e 27%, respectivamente, a formação de dienos conjugados e o ESL reduziu em apenas 17% a formação destes compostos.

Ramalho e Jorge<sup>25</sup> encontraram valores de dienos conjugados semelhantes aos determinados no presente trabalho, para o óleo de soja termoxidado a 180°C. Os valores de dienos conjugados para o óleo de soja no tempo inicial e após 10 horas de aquecimento, foram de 0,26 e 1,61%, respectivamente.

### CONCLUSÃO

A capacidade antioxidante das Misturas 1 (ESL + 50 mg.kg<sup>-1</sup>TBHQ) e 2 (ESL + 25 mg.kg<sup>-1</sup>TBHQ), superou o ESL e o TBHQ, adicionados ao óleo de soja na dosagem de 50 mg.kg<sup>-1</sup>. Portanto, o efeito sinérgico foi constatado entre os antioxidantes testados durante a termoxidação.

O tratamento Mistura 2 pode ser sugerido como uma prática tecnologicamente viável para reduzir a degradação oxidativa de óleos e gorduras, pois a ação

antioxidante dos tratamentos testados neste estudo foi: Mistura 1 = Mistura 2 > ESL > TBHQ > Controle.

---

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de Produtividade em Pesquisa.

---

### REFERÊNCIAS

1. Melo Filho OL, Sedyama CS, Moreira MA, Reis MS, Massoni GA, Piovesan ND. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. *Pesqui Agropecu Bras* 2004; 39(5): 445-50.
2. Abiove. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: URL: <http://www.abiove.com.br>.
3. Malacrida CR, Jorge N. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê-óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. *Braz J Food Technol* 2003; 6(2): 245-49.
4. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova* 2006; 29(4): 755-60.
5. Botterweck AA, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J, Van Den Brandt PA. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. *Food Chem Toxicol* 2000; 38(1): 599-605.
6. Almeida-Doria RF, Regitano-d'Arce MAB. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Cienc Tecnol Aliment* 2000; 20(2): 1-14.
7. Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR. Antioxidants. In: Akoh CC, Min DB. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. Marcel Dekker, New York, 2002, p. 489-516.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. *Compêndio da Legislação de Alimentos*. São Paulo: ABIA, 2001. v. 1, p. 326.
9. Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Literature data may underestimate the actual activity of cereals. *J Agric Food Chem* 2005; 53(13): 5036-40.
10. Pereira RB. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas [Dissertação de mestrado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. 90 pp.
11. Elmastas M, Isildak O, Turkekul I, Temur N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J Food Compos Anal* 2007; 20(3): 337-45.
12. Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur J Lipid Sci Tech* 2006; 108(9): 776-93.
13. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova* 2007; 30(2): 351-55.

14. Ferrari CKB, Torres EAFS. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. *Rev Bras Cancerol* 2002; 48(3): 375-82.
15. Reda SY, Leal ES, Batista EAC, Barana AC, Schnitzels E, Carneiro PIB. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. *Cienc Tecnol Aliment* 2005; 25(4): 672-6.
16. Fernandes JB, David V, Facchini PH, Silva MFGF, Filho ER, Vieira PC, Galhiane MS, Pagnocca FC, Bueno OC, Hebling MJ, Victor SR, Santos AMR. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Quim Nova* 2002; 25(6B): 1091-5.
17. Ibraf. Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: URL: <http://www.ibraf.org.br>.
18. Wangensteen H, Samuelsen AB, Malterud KE. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem* 2004; 88(2): 293-7.
19. AOCS. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: AOCS; 1993.
20. Banzatto DA, Kronka SN. Experimentação agrícola. 4. ed. Jaboticabal: Funep; 2006. p. 237.
21. Unesp. ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas. Jaboticabal, Versão 2.0. 1 disquete; 1999.
22. Brasil. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Diário Oficial da União, Brasília-DF, v. 196. 13 out. 1999. Seção I, 82-7 pp.
23. Andreo D. Efeito antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja sob aquecimento [Dissertação de Mestrado]. São José do Rio Preto, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2007. 94 pp.
24. Cella RCF, Regitano-d'Arce MAB, Spoto MHF. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. *Cienc Tecnol Aliment* 2002; 22(2): 111-6.
25. Ramalho VC, Jorge N. Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2006; 65(1): 15-20.

## Qualidade e autenticidade de amostras de chá de camomila (*Matricaria recutita* L. – Asteraceae)

Quality and authenticity of samples of chamomile tea  
(*Matricaria recutita* L. – Asteraceae)

RIALA6/1191

Gislaine Janaína Sanchez FALKOWSKI<sup>1</sup>, Ezilda JACOMASSI<sup>2</sup>, Orlando Seiko TAKEMURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense, UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, CEP 87502-210, Umuarama, PR, Brasil, e-mail: ezilda@unipar.br

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense, Umuarama, PR, Brasil.

Recebido: 15.04.2008 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade dos chás de camomila (*Matricaria recutita*), comercializadas na cidade de Umuarama-Paraná, essas amostras foram analisadas quanto à autenticidade do produto, características organolépticas, pureza, teor de umidade e cinzas totais, rotulagem e peso médio, em relação aos correspondentes dados indicados no rótulo da embalagem. A presente análise mostrou a presença de taxas de impurezas acima de 5% em 85,7% das amostras de chá em forma de capítulos florais íntegros e em 100% das amostras comercializadas na forma de *sachet*. O elevado teor de matéria orgânica estranha altera as características organolépticas do chá. Quanto aos descritivos nos rótulos da embalagem dos produtos verificou-se a falta de informações, o qual indica a não conformidade com a legislação vigente. Os dados do presente trabalho mostram que a maioria dos produtos comercializados não se encontrava em concordância com a legislação vigente. Torna-se, portanto, necessária maior assiduidade na ação fiscalizadora dos produtos alimentícios comercializados pela Vigilância Sanitária.

**Palavras-chave.** *Matricaria recutita*, ASTERACEAE, controle de qualidade, camomila.

### ABSTRACT

The quality of chamomile (*Matricaria recutita*) tea marketed in the Umuarama City, Pr was assessed. The product authenticity, organoleptic characteristics, purity, humidity, total ashes contents, products labeling, and medium weight of collected samples were analyzed. In 85,7% of the samples in dehydrated whole flowers form and in 100% of the samples in the tea bags form presented >5% of impurities. The occurrence of high contents of foreign organic matter changes the organoleptic characteristics of tea samples. Analyzing the description on the product labels, the lack of information was revealed, indicating non-conformity with the current legislation. According to the obtained results, it might deduce that the majority of analyzed products were not in accordance with Brazilian Drug Regulation. Thus, diligent efforts to carry out actions from sanitary surveillance are needed.

**Key words.** *Matricaria recutita* L., ASTERACEAE, quality control, chamomile.



## INTRODUÇÃO

*Matricaria recutita* L. pertence à família ASTERACEAE e trata-se de uma herbácea anual, conhecida popularmente como camomila-vulgar, camomila-alemã e maçanilha. Apresentam capítulos florais constituídos de receptáculo com flores tubulosas amarelas rodeadas de flores liguladas brancas, com odor aromático agradável e sabor levemente amargo<sup>1,2</sup>. A camomila tem indicação terapêutica como antiespasmódico e antiinflamatório, podendo ser utilizado na forma de infusão, na quantidade de 2 a 6 g, 3 vezes ao dia uso tópico, na forma de tintura a 5 % especificada na RDC nº 48/04<sup>3</sup> e RE nº 89/04<sup>4</sup>, sendo esta uma das plantas mais utilizadas em remédios naturais<sup>5</sup>.

A atividade anti-inflamatória da *M. recutita* foi comprovada experimentalmente em animais de laboratório e, posteriormente, em testes clínicos, respaldando o seu extenso uso popular. A atividade anti-inflamatória da planta está relacionada à presença de óleo essencial constituído de matricina e alfa-bisabolol, enquanto a elevada concentração de flavonoides é responsável pela atividade espasmolítica<sup>6</sup>.

Em diversos países, o consumo de plantas medicinais vem crescendo consideravelmente. Essa tendência pode ser explicada por diferentes fatores, como o alto custo dos medicamentos industrializados, os efeitos indesejáveis dos medicamentos sintéticos e o próprio modismo<sup>7,8,9</sup>.

Apesar da expansão desse setor farmacêutico, os parâmetros de qualidade, eficácia e segurança não vêm sendo acompanhados adequadamente<sup>9,10</sup> e somente em 1995 foi elaborada uma legislação específica, através da Portaria 6/MS/SNVS<sup>11</sup>, a qual foi discutida amplamente, através de sucessivas consultas públicas, resultando na RDC 17/2000 que foi substituída posteriormente pela RDC 48/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)<sup>3,12</sup>.

Embora existam parâmetros específicos para que se comercializem plantas medicinais com qualidade, o não cumprimento da legislação vigente é conhecido no Brasil e em algumas pesquisas já realizadas. Numa pesquisa realizada com camomila, melissa e menta, 100% das amostras apresentaram elevado percentual de elementos estranhos ou baixa concentração de óleo volátil<sup>13</sup>. Em amostras de fitoterápicos comercializadas em Curitiba, 48,3% se mostraram insatisfatórios<sup>9</sup>. Na análise de amostras de fitoterápicos comercializadas em Recife-PE, foi observado que todas as amostras de boldo, pata de vaca e Ginkgo, estavam irregulares<sup>10</sup>.

Diante desta realidade, o presente estudo objetivou verificar a qualidade dos produtos contendo camomila, comercializada na cidade de Umuarama, região noroeste do Estado do Paraná.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ■ Material analisado

Foram realizadas análises de 19 amostras de camomila, obtidas em supermercados e farmácias na cidade de Umuarama - Pr. Dentre as 19 amostras analisadas, 12 estavam na forma de sachês e 7 na forma de capítulos florais íntegros.

Cada amostra foi analisada seguindo os padrões da Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>, normas segundo a ANVISA e comparação com amostra padrão coletado no inverno de 2004 e 2005 no Horto de Plantas Medicinais campus 2 da UNIPAR – Umuarama - Pr, e também comparação com a exsicata de *Matricaria recutita* L. sob o nº 2061, depositada no Herbário Educacional da Universidade Paranaense (HEUP).

### ■ Estudo de identidade

Para as amostras de *M. recutita* com capítulos florais íntegros, foram feitas análises macroscópicas, cortando o capítulo floral ao meio, enquanto que as amostras na apresentação em sachês foram feitas análises com auxílio de lupa estereoscópica. As flores tubulosas também foram observadas com auxílio de lupa estereoscópica. Nas análises buscou-se identificar estruturas morfológicas descritas na Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>. As amostras foram comparadas com padrões autênticos de *M. recutita*.

### ■ Análises organolépticas

As amostras adquiridas no comércio de Umuarama, PR, foram submetidas a análises organolépticas no que se refere à cor e odor, sendo estas comparadas com as amostras autênticas de *M. recutita* do Horto Medicinal coletadas nos anos de 2004 e 2005.

### Verificação da presença de materiais estranhos

As amostras obtidas na forma de sachês foram separadas por quarteamento, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup> e separadas com auxílio de lupa estereoscópica. As amostras obtidas na forma de capítulos florais íntegros foram submetidas ao quarteamento e separadas a olho nu seguido de pesagens, sendo os resultados expressos em porcentagem.

#### ■ Determinação de cinzas totais

O método utilizado foi o gravimétrico, descrito na Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>. Os testes foram realizados em triplicata, pesando aproximadamente 1,5 g, levadas a mufla em temperatura de 450°C por cinco horas, em seguida foram levadas à estufa em temperatura de 105°C por uma hora e ao dessecador até temperatura ambiente, calculando-se a porcentagem de cinzas totais.

#### ■ Determinação de umidade

Foi utilizado o método gravimétrico, descrito na Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>. As amostras analisadas em triplicata, pesando aproximadamente 2,0 g, levadas a estufa em temperatura de 105°C por cinco horas e ao dessecador até temperatura ambiente. A operação foi repetida até que pesagens sucessivas não diferissem entre si por mais de 5 mg. Os resultados foram expressos em porcentagem.

#### ■ Análises das rotulagens

A rotulagem foi avaliada de acordo com Resolução – RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002 da Anvisa<sup>14</sup> e Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>, através da elaboração de uma planilha de verificação da rotulagem, incluindo os seguintes dados: Nome do Fabricante; Logomarca da Empresa; Endereço Completo; CNPJ; Sigla e Nº de Registro no M.S.; Lote; Fabricação; Validade; Presença da Frase “Indústria Brasileira” no Painel Frontal; Categoria do Produto (conteúdo); Nomenclatura Botânica; Tabela Nutricional; Proteção da Luz; “Informação Referente ao Glúten”; Peso Indicado no Painel Frontal; Designação “Chá de Camomila”; Instruções de Preparo; Indicação Medicamentosa e/ou Terapêutica; Idioma Português; Frase “Isento de Registro” e Armazenamento de Um Ano<sup>15, 16, 2</sup>.

#### ■ Análise do peso correspondente à embalagem

As amostras em triplicata foram pesadas, calculando-se a média e o desvio padrão. O resultado obtido foi comparado com o indicado na embalagem, verificando se estava dentro dos 9 % permitido pela Lei nº 9933, de 20 de dezembro de 1999<sup>17</sup> e Portaria Inmetro nº 96, de 07 de abril de 2000<sup>18</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### ■ Estudo de identidade

Todas as amostras analisadas na presente pesquisa apresentaram características correspondentes à amostra padrão de *Matricaria recutita*, e também características

descritas na Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>, como flores amarelas tubulosas e flores liguladas brancas. As amostras analisadas a olho nu foram 100% aprovadas por apresentarem receptáculo floral oco, sendo esta uma característica que pode diferenciar a camomila, de outras espécies da família Asteraceae<sup>2</sup>.

Resultados semelhantes foram reportados em uma pesquisa da qualidade de amostras de chás de plantas medicinais, realizada em Belo Horizonte/MG, onde todas as amostras analisadas de camomila mostraram-se autênticas<sup>13</sup>.

#### ■ Análises organolépticas

Na análise sensorial, 75% das amostras na forma de sachês, e 42,9% das amostras na forma de capítulos florais íntegros foram reprovadas. Tal reprovação se deu, principalmente, pelas amostras não apresentarem cor e odor característicos.

Esse alto índice de reprovação pode ser resultado da manipulação inadequada da planta, ou ainda pela presença de matéria orgânica estranha nas amostras avaliadas (Tabelas 1 e 2).

A colheita da planta em horário impróprio, o sol e a temperatura não controlada na secagem, podem diminuir a quantidade de óleo essencial, levando, assim, à perda da propriedade medicinal que a *M. recutita* possui<sup>19</sup>.

No caso da camomila, a presença de elementos orgânicos estranhos, principalmente caule, pedúnculo e outras partes da planta, conferem à planta, características organolépticas alteradas, o que ficou evidenciado nos testes realizados<sup>9</sup>.

Não se descarta ainda a hipótese de alterações com relação ao armazenamento que, quando feito de maneira inadequada, pode aumentar a carga fúngica e acelerar a sua deterioração. A conservação da planta após a embalagem é de suma importância. Necessita estar em local com temperatura ambiente, recipientes bem fechados, protegidas da luz e dos insetos, por um período não superior a um ano, porém o alto teor de reprovação se dá devido à grande quantidade de impurezas, dentre essas: pedras, insetos e, na sua maioria, pedúnculos e caules<sup>14</sup>.

#### ■ Verificação da presença de materiais estranhos

A Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup> permite no máximo 5% de materiais estranhos, contendo pedúnculos de capítulos florais ou de corpos estranhos. No entanto, foi encontrada uma variação de impurezas de 3,92% a 28% para capítulos

**Tabela 1.** Características organolépticas (cor e odor) e impurezas em amostras de camomila (sachês) comercializadas na cidade de Umuarama - PR

Amostras	Cor	Odor	Impurezas (%)
A	C	C	6,17
B	NC	NC	95,42
C	NC	NC	92,56
D	NC	NC	83,53
E	NC	NC	82,41
F	NC	NC	65,59
G	NC	NC	92,28
H	NC	NC	95,37
I	C	C	32,10
J	C	C	73,40
K	NC	NC	45,38
L	NC	NC	17,67
% rep. e NC	75,00	75,00	100,00

Legendas: C = Característico.  
NC = Não característico.

**Tabela 2.** Características organolépticas (cor e odor) e impurezas em amostras de camomila (capítulos florais íntegros) comercializadas na cidade de Umuarama - PR

Amostras	Cor	Odor	Impurezas (%)
M	NC	NC	8,98
N	C	C	19,25
O	C	C	3,92
P	NC	NC	7,96
Q	C	C	16,30
R	NC	NC	16,02
S	C	C	28,00
% rep. e NC	42,86	42,86	85,71

Legendas: C = Característico.  
NC = Não característico.

florais íntegros e 6,17% a 95,42% para amostras na forma de sachês (Tabelas 1 e 2). O índice de reprovação dos capítulos florais íntegros foi de 85,71% e para amostras com apresentação em sachês a reprovação foi de 100 %.

Os índices superiores ao permitido de matéria estranha podem ser resultados de manejo, limpeza e separação inadequados, sendo um problema frequente nos

produtos à base de plantas medicinais comercializados no Brasil. A presença de um alto teor de elemento estranho compromete a qualidade da droga, interferindo na sua eficácia e pondo em risco a saúde do consumidor<sup>19,10</sup>.

A adulteração das plantas medicinais é um método fraudulento e, como atualmente a grande parte da população é “encorajada” a consumir plantas medicinais,

por serem naturais e ditas seguras, acabam se deparando com efeitos adversos, como reações alérgicas e até um choque anafilático<sup>20,5,21</sup>.

Considerando as propriedades anti-inflamatórias e antiespasmódicas da camomila, a adição de mais de 5% de materiais estranhos poderia diminuir a sua eficácia. Mesmo considerando que a camomila é tratada como produto alimentício na RDC nº 23, de 15 de março de 2000<sup>22</sup>, e com isso, o seu controle de qualidade não se torna mais tão rigoroso. No caso, se fosse tratado como um fitoterápico. A ausência de legislação regulatória em produtos alimentícios permitem abusos como os encontrados neste trabalho, onde em algumas amostras, o teor de matéria orgânica estranha superou os 90%.

#### ■ Determinação de cinzas totais

Todas as amostras apresentaram teores de cinzas totais dentro do limite permitido de 14% pela Farmacopeia Brasileira (2000), demonstrando estar em conformidade com os valores estabelecidos, conforme consta nas Tabelas 3 e 4. Valores acima do padrão poderiam indicar contaminação por materiais inorgânicos, como areia e pedras<sup>23,24</sup>.

#### ■ Determinação de umidade

Apenas uma das amostras analisada na forma de capítulos florais íntegros foi reprovada (Tabela 4) por possuir valor de umidade acima de 14%. Teores elevados de umidade

podem favorecer a proliferação de microorganismos, deterioração do material e intoxicação ao consumidor devido à provável presença de fungos e bactérias<sup>13</sup>. Todas as amostras analisadas na forma de sachês foram aprovadas.

Nenhuma amostra apresentou valor abaixo de 8% de umidade, o que poderia indicar a dessecação excessiva e perda do óleo essencial por método inadequado de secagem.

#### ■ Análises das rotulagens

No Brasil, a Anvisa é o órgão responsável pela regulação da rotulagem de alimentos e estabelece quais são as informações que um rótulo deve conter. De acordo com a Anvisa os rótulos são elementos essenciais de informação entre produto e consumidores, sendo assim é importante que as informações sejam claras para poderem ser utilizadas para informar o consumidor<sup>25</sup>.

Também o Código de Defesa do Consumidor (CDC), que é regulamentado pela Lei nº8078/90, protege o consumidor da ação da publicidade enganosa ou abusiva<sup>26</sup>.

Os dados obtidos constam na Tabela 5, apresentados como irregularidades em percentual, em que foram encontrados nos produtos avaliados.

Alguns itens são considerados imprescindíveis pela Resolução – RDC nº 259/02<sup>14</sup>, porém a obrigatoriedade de itens nos rótulos dos chás de camomila parece ainda gerar

**Tabela 3.** Cinzas totais, teores de umidade e erro padrão da média em amostras de camomila (sachês) comercializadas na cidade de Umuarama - PR

Amostras	Cinzas totais (%)	EPM (%)	Teor de umidade (%)	EPM (%)
A	7,47	0,09	8,85	0,07
B	5,84	0,01	9,00	0,08
C	8,85	0,04	8,68	0,07
D	5,77	0,09	9,98	0,22
E	6,60	0,04	8,77	0,43
F	6,12	0,10	9,02	0,24
G	6,04	0,05	9,19	0,06
H	7,16	0,12	10,33	0,12
I	6,28	0,38	9,98	0,28
J	8,88	0,13	12,45	0,19
K	7,53	0,08	10,07	0,41
L	8,89	0,11	10,08	0,28

\* EPM = Erro Padrão da Média (n = 3)

**Tabela 4.** Cinzas totais, teores de umidade e erro padrão da média em amostras de camomila (capítulos florais íntegros) comercializadas na cidade de Umuarama - PR

Amostras	Cinzas totais (%)	EPM (%)	Teor de umidade (%)	EPM (%)
M	9,11	0,04	15,79	0,31
N	7,92	0,06	9,09	0,24
O	8,44	0,13	8,10	0,23
P	8,58	0,02	11,57	0,54
Q	9,99	0,07	12,48	0,70
R	8,63	0,02	10,70	1,01
S	8,76	0,22	12,84	0,27

\* EPM = Erro Padrão da Média (n = 3)

**Tabela 5.** Análise dos componentes de rotulagens de chás de camomila comercializados na cidade de Umuarama - PR

Dados analisados	Irregularidades (%)
Nome do fabricante	5,26
Logomarca da empresa	5,26
Endereço completo	10,53
CNPJ	10,53
Sigla e nº de registro no M.S.	10,53
Lote	26,32
Fabricação	68,42
Validade	5,26
"Indústria brasileira" (painel frontal)	47,37
Categoria do produto (conteúdo)	42,11
Nomenclatura botânica	47,37
Tabela nutricional	26,32
Proteção da luz	26,32
"Informação referente ao glúten"	57,89
Peso	5,26
Designação ("Chá de camomila")	36,84
Instruções de preparo	31,58
Indicação medicamentosa e/ou terapêutica	10,53
Idioma português	10,53
Frase "Isento de registro"	21,05
Armazenamento de 1 ano	66,67

muitas dúvidas, pois 42,11 % dos produtos avaliados não apresentaram em sua embalagem a categoria do produto, como sendo capítulos florais de camomila; 31,58% não apresentaram as instruções de preparo, sendo estes itens obrigatórios.

A data de fabricação, segundo a Resolução – RDC nº 259/02<sup>14</sup> não é item obrigatório. Assim, foi possível avaliar somente 31,6% das amostras, quanto ao prazo de validade de 1 (um) ano a partir de sua colheita, exigido pela Farmacopeia Brasileira<sup>2</sup>. A não exigência da mesma,



torna mais difícil o acompanhamento da manutenção das qualidades dos produtos que garantiriam a comercialização de produtos de melhor qualidade.

Ainda na vigência da Portaria nº 519/98<sup>27</sup> havia meios de coibir fraudes e garantir o controle de qualidade dos chás, porém, com o início da vigência da Resolução nº 23/00<sup>22</sup> passou-se a considerar a camomila como alimento. Desta forma, os critérios de controle de qualidade não são tão rigorosos.

Posteriormente, entram em vigência a RDC nº 267/05<sup>28</sup> e a RDC nº 219/06<sup>29</sup> que regulamentam critérios para alimentos e bebidas de origem vegetal. Nelas, são definidas as espécies vegetais e suas respectivas partes, entretanto não estabelecem parâmetros técnicos mais precisos da matéria prima vegetal destinados aos chás. Desta forma, criam-se lacunas que possibilitam a utilização de matérias-primas de baixa qualidade, já que não existem parâmetros legais bem definidos.

Quanto ao registro, a RDC nº 278/05<sup>30</sup>, no anexo I, trata os chás como produtos dispensados de registros, porém na mesma Resolução no seu anexo II, quando existe na embalagem qualquer citação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua embalagem, o registro torna-se necessário.

Analisando as amostras, quanto à presença de registro no Ministério da Saúde, as amostras C e E apresentaram registro, porém as amostras A e J, apesar de conterem indicação terapêutica no rótulo, não possuíam registro.

A presença da nomenclatura botânica, assim como a ortografia correta foram encontradas em apenas 53,6% das amostras analisadas.

Quando tratadas como alimentos, a Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003<sup>31</sup>, obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Pode-se verificar que 57,89% das amostras

**Tabela 6.** Peso médio (n = 3) e erro padrão da média das embalagens de camomila comercializadas na cidade de Umuarama - PR

Amostras	Peso da embalagem	Média	EPM
A	1,0 g	1,05	0,02
B	1,0 g	1,12	0,01
C	1,0 g	0,91	0,01
D	1,0 g	1,02	0,02
E	1,0 g	1,14	0,04
F	1,0 g	1,06	0,05
G	1,0 g	0,98	0,00
H	1,0 g	1,27	0,04
I	1,0 g	1,18	0,00
J	ND	-	-
K	1,0 g	0,97	0,03
L	1,0 g	1,05	0,05
M	10,0 g	10,13	0,46
N	40,0 g	42,10	0,50
O	20,0 g	20,00	0,02
P	7,0 g	61,00	1,26
Q	5,0 g	5,60	0,18
R	ND	-	-
S	5,0 g	6,73	0,11

\* ND = não determinado.

\* EPM = erro padrão da média.

não traziam a informação referente ao glúten, infringindo a legislação vigente.

Apesar da não obrigatoriedade da tabela nutricional em chás<sup>32,33</sup>, somente 26,32% das amostras não traziam a tabela nutricional. A tabela nutricional é apenas informativa, não garantindo o consumo seguro e saudável com capacidade de garantir direito à alimentação adequada.

#### ■ Análise do peso médio correspondente à embalagem

Todas as amostras analisadas com relação ao peso real foram aprovadas, conforme demonstrado na Tabela 6, estando em conformidade com a Lei nº 9933/99 e Portaria INMETRO nº 96/00. A legislação permite uma tolerância de variações de até 9% do peso total<sup>17, 18</sup>.

#### CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que os chás de camomila não se encontravam adequados em todos os testes realizados, apresentando elevado teor de matéria orgânica estranha, tornando a cor e odor não característicos. Os parâmetros de avaliação da rotulagem mostraram-se irregulares para alguns itens analisados. Portanto, torna-se necessária uma maior assiduidade da fiscalização da Vigilância Sanitária no que diz respeito ao controle de qualidade e rotulagem, pois a ausência da qualidade é um fato preocupante, uma vez que a camomila é utilizada com fins medicinais pela população.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro recebido da Universidade Paranaense UNIPAR

#### REFERÊNCIAS

1. Duarte MR, Lima MO. Análise farmacopéica de amostras de camomila – *Matricaria recutita* L., Asteraceae. *Visão Acadêmica* 2003; 4(2): 89-2.
2. Farmacopeia Brasileira. 4ª. ed. São Paulo: Atheneu; 2000.
3. Brasil. Resolução RDC nº 48, de 16 de mar. 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
4. Brasil. Resolução RE nº 89, de 16 de mar. 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o registro simplificado de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
5. Valdir Junior FV, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova* 2005; 28(3): 519-28.
6. Brandão MGL. Recomendações para avaliação da qualidade de drogas e extratos vegetais pelas farmácias de manipulação. *Infarma* 1997; 6(1/2): 6-9.
7. Brandão MGL, Freire, N, Vianna-Soares, CD. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. *Cad Saúde Pública* 1998; 14(3): 613-16.
8. Costa CC et al. Qualidade de folhas de Guaco (*Mikana glomerata Sprengel*) após secagem e embalagem. *Rev Bras Pl Med* 1999; 1(2): 1-5.
9. Duarte MR, Bardal D. Qualidade de amostras de fármacos vegetais comercializados em Curitiba, PR. *Visão Acadêmica* 2002; 3(2): 65-8.
10. Melo JG et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). *Rev Bras Farmacognosia* 2004; 14(2): 111-120.
11. Brasil. Portaria nº 06, de 31 de jan. 1995 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 01 fev. 1995.
12. Virgílio LJ, Marques LC. Avaliação dos efeitos da Resolução RDC 17 sobre fitoterápicos de registros antigos. *Rev Bras Farmacognosia* 2004; 14(supl 1): 3-6.
13. Brandão MGL et al 2002. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. *Rev Bras Pl Med* 2002; 5(1): 56-9.
14. Brasil. Resolução RDC nº 259, de 20 de set. 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 23 set. 2002.
15. Bello CM, Montanha JA, Schenkel EP. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2002; 12(2): 75-3.
16. Copetti FB, Griebeler, AS. Análise da adequação da rotulagem de medicamentos fitoterápicos. *Infarma* 2005; 17(7/9): 60-64.
17. Brasil. Lei nº 9.933, de 20 de dez. 1999 do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Dispõe sobre as competências do Conmetro e do Inmetro. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 21 dez. 1999. p.1
18. Brasil. Portaria nº 96, de 07 de abr. 2000 do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Aprova o Regulamento Técnico Metrológico estabelecendo critérios sobre o controle de Produtos Pré-Medidos comercializados em unidade de massa e volume de conteúdo nominal igual, de lotes de 5 a 49 unidades no ponto de venda. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 12 abr. 2000.
19. Brito ALO et al. Principais cuidados no cultivo, manipulação e consumo de plantas medicinais: erros e problemas mais comuns. 2004. Disponível em: [http://www.plantamed.com.br/DIV/CULTIVO\\_COLHEITA\\_MEDICINAL.htm](http://www.plantamed.com.br/DIV/CULTIVO_COLHEITA_MEDICINAL.htm). Acesso em: 10 out. 2006.
20. Camargo L. *Jornal A Notícia*. Disponível em: <http://www.saude.sc.gov.br/noticias/novo/clipping%202004/junho/14%20junho.htm>. Acesso em: 10 out. 2006.
21. Vieira RA. Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais “Prof. Ricardo Vieira”. 2006. Disponível em: [http://www.univille.net/pagina.phtml?id\\_pagina=3360](http://www.univille.net/pagina.phtml?id_pagina=3360). Acesso em: 5 out. 2006.

22. Brasil. Resolução RDC nº 23, de 15 de mar. 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre O Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 mar. 2000.
23. Barbosa MCS et al. Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus Molina*) comercializados em Curitiba, PR. *Rev Bras Farmacogn* 2001; 11(1): 1-4.
24. Brandão MGL et al. Qualidade de amostras comerciais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos: drogas inscritas na farmacopeia brasileira. *Infarma* 2001; 13(11/12): 60-61.
25. Organização das Nações Unidas. Comitê Permanente de Nutrição. Rotulagem de alimentos da perspectiva do direito ao consumo seguro e saudável. Disponível em: [http://www.drt2004.saude.gov.br/nutricao/evento/scn/docuemntos/relatorios/Relatorio\\_Rotulagem\\_Alimentos.pdf](http://www.drt2004.saude.gov.br/nutricao/evento/scn/docuemntos/relatorios/Relatorio_Rotulagem_Alimentos.pdf). Acesso em: 5 out. 2006.
26. Procon. Instituto de Defesa do Consumidor. Rotulagem dos Produtos Alimentícios. Disponível em: [http://www.procon.df.gov.br/005/00502001.asp?ttCD\\_CHAVE=4585](http://www.procon.df.gov.br/005/00502001.asp?ttCD_CHAVE=4585), Acesso em: 16 out. 2006.
27. Brasil. Portaria nº 519, de 26 de jun. 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de “Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 jun. 1998.
28. Brasil. Resolução RDC nº 267, de 22 de set. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o “regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2005.
29. Brasil. Resolução RDC nº 219, de 22 de dez. 2006 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova a inclusão do uso das espécies vegetais e parte(s) de espécies vegetais para o preparo de chás. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 dez. 2006.
30. Brasil. Resolução RDC nº 278, de 22 de set. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova as categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2005.
31. Brasil. Lei nº 10.674 de 16 de mai. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 mai. 2003b. Seção 1, p.1.
32. Brasil. Resolução RDC nº 175, de 08 de jul. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova “Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 jul. 2003.
33. Brasil. Resolução RDC nº 360, de 23 de dez. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 dez. 2003.

Hygiene conditions of the self-service restaurants by evaluating the microbial quality of the mixed-food preparations

## Condições higiênico-sanitárias de restaurantes comerciais tipo self-service pela avaliação da qualidade microbiológica de alimentos de preparações mistas

RIALA6/1192

Tânia Maria de Souza GENTA<sup>1</sup>, Jane Martha Gratton MIKCHA<sup>2</sup>, Graciette MATIOLI<sup>3\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Avenida Colombo 5790, Bloco P02, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil, e-mail: gmatioli@uem.br

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

Recebido: 05.09.2008 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### ABSTRACT

Hygiene conditions of the self-service restaurants located at the central region of Maringá city, Paraná, were evaluated by surveying the microbiological quality of the food provided for customers. Thirty-four mixed-food preparations samples were collected from the self-service counters of 18 restaurants, which serve 100 or more meals/day. In order to evaluate on the Good Practices procedures observance, a checklist was administered to five restaurants, just to those considered critical and presenting microbiological standards above the limits allowed by the Resolution N° 12/2001-Brazilian Ministry of Health. One of the eighteen investigated restaurants received training on Good Practices procedures, which was evaluated by means of the checklist before and nine months after training. The microbiological analyses showed eight food samples contaminated with coliforms at 45°C, and one sample with coagulase-positive staphylococci. No contamination by *Salmonellas* sp. was found in all of the analyzed samples. Based on the number of *non-conformities* found in the checklist items those considered as crucial for safe food preparation, all of five restaurants were classified as critical. One restaurant, which was trained on the Good Practices procedure, received *non-conformity* ranking of 60.9% and 50.9% before and after the training, respectively, and these data indicated that little progress had been made. Education programs implementation both food handlers and consumers is a strategy for reducing the occurrence of food-borne diseases.

**Key words.** food microbiology, food contamination, restaurants, food quality.

### RESUMO

No presente estudo foi realizada a avaliação das condições higiênico-sanitárias quanto à qualidade microbiológica em restaurantes self-service da região central de Maringá, Paraná. Foram coletadas amostras de alimentos de preparações mistas de restaurantes que servem cem ou mais refeições/dia. Trinta e quatro amostras de alimentos foram coletadas nas áreas de distribuição de dezoito restaurantes para análise microbiológica. Foi aplicado um *check-list* para avaliar o cumprimento de Boas Práticas em cinco restaurantes, que foram considerados críticos e que apresentaram resultados de padrões microbiológicos acima dos permitidos pela Resolução n° 12/2001 do Ministério da Saúde. Um dos dezoito restaurantes pesquisados recebeu treinamento em Boas Práticas, e a avaliação foi efetuada pela aplicação do *check-list* antes da orientação e nove meses após o treinamento. As análises microbiológicas mostraram contaminação por coliforme a 45°C em oito amostras de alimento e uma amostra contaminada por estafilococos coagulase positiva. Em nenhuma amostra foi detectada *Salmonella* sp. Baseando-se no número de *Não conformidades* apresentado em relação aos itens considerados como imprescindíveis para a produção de alimentos seguros, todos restaurantes foram classificados críticos. Um restaurante apresentou resultados de 60,9% e 50,9% de *Não Conformidades*, respectivamente antes e após o treinamento de Boas Práticas, indicando que houve pouco avanço quanto a melhoria de qualidade dos serviços realizados. A implementação de programas educativos para consumidores e manipuladores é relevante como estratégia para reduzir a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos.

**Palavras-chave.** microbiologia dos alimentos, contaminação de alimentos, restaurantes, qualidade dos alimentos.

## INTRODUCTION

There have been many changes in the population's eating habits in recent decades<sup>1</sup>, caused by diverse reasons. The success and continued growth of self-service restaurants are due to their practicality and quick service, as well as the appeal of homemade meals at lower prices, achieved by the reduction of services offered at the customer's table.

This change in people's eating habits has led to concerns about preventing foodborne diseases<sup>1</sup>. In Brazil, very few occurrences of foodborne diseases are observed by the health services, although they are supposed to be higher due to a lack of knowledge about basic sanitation, a lack of basic hygiene in the production of food, and even due to the deficiency of disease notification systems<sup>2</sup>.

According to epidemiological information from the Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, the most frequent foodborne diseases agents are bacteria such as *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* sp, *Bacillus cereus* and *Clostridium* sp. Among the foods most frequently involved are those of mixed preparation (which include raw materials of both vegetable and animal origin, such as mayonnaise and pancakes, etc.) at 42% and those of animal origin at 34.7% of cases<sup>3</sup>.

The foodborne diseases are one of the main problems of public health worldwide<sup>1</sup> and there is a global concern with strategies for their control and for ensuring that safe food products reach the consumer<sup>4</sup>. According to Antunes<sup>3</sup>, the handling procedures of the foods and the health of the food handlers themselves are of fundamental importance in the epidemiology of foodborne diseases, which can be controlled by the adoption of Good Practices by food-producing establishments.

According to the Resolution nº 216/2004 (govt. edict), published by the Ministério da Saúde, the Good Practices (GP) are obligatory procedures for food services in order to guarantee hygienic conditions in food preparation<sup>5</sup>.

To implement the GP, the first step is to administer a checklist (questionnaire) to evaluate Conformities and Non-Conformities in all the food production stages. Based on the result of the initial evaluation, a Plan of Action is created according to the Non-Conformities found, and then the correct procedures are established. The most critical items for controlling risks to the consumers' health should be prioritized<sup>6</sup>. According to Tomich et al.<sup>7</sup>, the checklist has been used in food production and

retail establishments for evaluating the use of GP and as a basis for visiting health and safety inspectors, as well as for verification by the establishment itself.

The microbiological analysis of food is fundamental to the evaluation of hygienic conditions and the use of GP in restaurants. The microbial determinations enable the evaluation of the product with regard to the application of hygienic practices throughout the whole process of production, from manufacture and display up to consumption<sup>8</sup>.

In the light of this, this work aimed to verify the hygiene conditions in commercial self-service restaurants by evaluating the microbial quality of the mixed-preparation foods they serve, and to offer GP training to a restaurant in which a high rate of non-conformity was observed.

## MATERIAL AND METHODS

### ■ Sample

Out of the 72 restaurants located in the city center of Maringá, Paraná State, Brazil, registered in 2003 by the Secretária de Saúde Municipal for the coordination of the Sanitary Vigilance program, a sample of 18 self-service commercial restaurants, which served over 100 meals/day, were studied.

### ■ Sample Collection

For the microbiological analysis, samples of boiled, baked, roasted and fried food, all from mixed preparations, i.e. foods that include raw materials of both animal and vegetable origin (e.g. mayonnaise, meat pies, pancakes, etc), according to the definitions described in the foodborne diseases outbreak tables of the Paraná Secretaria de Saúde do Estado do Paraná<sup>3</sup> were analyzed. The samples were collected by technicians from the Vigilância Sanitária Municipal program in April 2004 and July 2005. Thirty-four samples of 200g of food were collected, and, depending on the menus of the respective restaurants, between one and three samples being taken from each restaurant.

The collections occurred at the self-service counters of the restaurants, at least one hour before the buffets were opened to the public. The samples were stored in sterilized plastic packs, which were labeled and carried in isothermal containers, accompanied by reports identifying the restaurant, date, time and method of collection. The samples were kept under refrigeration between 0 and 4° C up to the time of the microbiological analysis.



### ■ Microbiological Analysis

Based on Resolution n° 12/2001 of the Ministério da Saúde, which is responsible for establishing the sanitary microbiological standards for food<sup>9</sup>, the microbial contaminants with the highest prevalence rates in mixed-preparation foods are: *Coliforms* at 45°C, *Staphylococcus coagulans positive* and *Salmonella sp.* Rates of *Coliforms*, at 45°C, over the permitted limits, indicate the absence of, or faults in, Good Practices of Hygiene. The presence of *Salmonella sp.* is considered a public health problem and is not tolerated by Brazilian legislation.

Food analyses were performed by the Most Probable Number (MPN) method for the quantification of *Coliforms* at 45°C, *Staphylococcus coagulans positive* counting and *Salmonella sp* research. The research was carried out according to American Public Health Association methodology, described in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods<sup>10</sup>.

### ■ Checklist

A checklist, based on the Safe Food Program (PAS), was created to evaluate the hygiene conditions of the restaurants that had contaminated samples, and was used between 2001 and 2004 for the implementation of GP<sup>6</sup>. The checklist was simplified to group similar questions and to eliminate items not required by legislation for self-service restaurants, which related to table service, and other items that did not apply to the individual establishments studied. Sixty-four critical items and thirty-eight non-critical items from the original model were maintained, producing a total of 112 items. According to Tomich et al.<sup>7</sup>, the critical items are those regarded as essential for protection against foodborne diseases, and which need immediate correction when it is found that they are not followed. When an establishment has Non-Conformities in the critical items, it is regarded as a critical problem in the production of their food<sup>6</sup>.

The possible answers in the checklist were: “In Conformity” (C), when the restaurant followed the observed criterion; “Non-Conformity” (NC), when the restaurant did not follow the observed criterion; and “Not-Applicable” (NA), when the item was not applicable to the place or sector evaluated<sup>6</sup>. The restaurants were classified as ‘critical’ when they had one or more Non-conformity for items regarded as critical for the safe production of food.

### ■ The Good Practices Training Program

The training program lasted about 3 months. All the workers, including the manager, took part in the training.

The program lasted for a total of 15 hours, and its content was based on the *Cartilha do Manipulador de Alimentos* (Food Producers’ Guide) by PAS<sup>11</sup>. The main topics covered were: a) the safe preparation of food, b) physical, chemical and biological food risks, c) personal hygiene, d) personal work conduct, e) the physical structure and layout of the production and service areas and equipment and environmental hygiene, f) water quality, g) disease control, h) choosing suppliers and the purchasing of goods, j) safety criteria in the production stages and the maintenance and display of food, and h) the importance of team work.

### ■ Statistical Methods

The qualitative analysis of the microbiological and checklist results was carried out through the use of tables and graphs. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests, with a 5% level of significance, were used to evaluate the differences among the restaurants with regard to Non-Conformities. The software package Statistica 6.0/2001 (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, EUA) was used.

## RESULTS

The results obtained from the microbiological analyses were evaluated according to Resolution n° 12/2001<sup>9</sup>, whose established standards for ready-made savory products to be consumed with or without stuffing, mixed salads, ready-made mixed-meat dishes, cereal and flour are: 10<sup>2</sup>/g for *Coliforms* at 45°C, 10<sup>3</sup>/g for *Staphylococcus coagulans positive* and a total absence for *Salmonella sp.*

Table 1 shows results from the microbiological analyses of the 34 samples collected in the 18 establishments. Contamination by *Coliforms* at 45 °C was over the limits permitted by law in 8 samples (23.5%) and contamination by *Staphylococcus coagulans positive* was over the limits in one sample (2.9%). Contamination by *Salmonella sp.* was not found in any of the samples. Restaurants 14 and 15 showed contaminated results in more than one sample. From the 18 restaurants researched, six (33.3%) showed positive contamination results and 12 (66.6%) did not show any contamination in the samples analyzed.

**Table 1.** Microbiological analyses results of 34 samples of mixed-food preparations collected in 18 self-service restaurants in the city center of Maringá, Paraná State, during 2004 and 2005

Restaurant Code	SAMPLE 1		SAMPLE 2		SAMPLE 3	
	Coliforms at 45°C (MPN/g)	Staph. coag. posit. (CFU/g)	Coliforms at 45°C (MPN/g)	Staph. coag. posit. (CFU/g)	Coliforms at 45°C (MPN/g)	Staph. coag. posit. (CFU/g)
1	<3	<10 <sup>2</sup>				
2	4	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
3	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
4	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
5	<3	<10 <sup>2</sup>	<b>4.6x10<sup>2</sup></b>	<10 <sup>2</sup>		
6	<3	<10 <sup>2</sup>	<b>≥2.4x10<sup>3</sup></b>	<10 <sup>2</sup>		
7	<3	<10 <sup>2</sup>	9.3x10 <sup>1</sup>	<10 <sup>2</sup>		
8	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
9	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
10	9	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
11	<3	<10 <sup>2</sup>	<b>1.1 x 10<sup>3</sup></b>	1.5 x 10 <sup>2</sup>		
12	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	6.5 x 10 <sup>2</sup>		
13	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
14	<3	<10 <sup>2</sup>	<b>≥2.4x10<sup>3</sup></b>	<10 <sup>2</sup>	<b>≥2.4x10<sup>3</sup></b>	<10 <sup>2</sup>
15	<b>≥2.4x10<sup>3</sup></b>	<10 <sup>2</sup>	<b>1.5x10<sup>2</sup></b>	<10 <sup>2</sup>		
16	<3	<10 <sup>2</sup>	<3	<10 <sup>2</sup>		
17	<b>≥2.4x10<sup>3</sup></b>	<b>1.4x10<sup>3</sup></b>				
18	<3	<10 <sup>2</sup>				

Standards established by RDC No. 12/2001: Coliforms at 45°C = 10<sup>2</sup>/g, Staphilococcus coagulasis positive =10<sup>3</sup>/g.

The mixed preparations which were contaminated by *Coliforms* at 45°C were: lasagna bolognese, chicken salad, vegetable salad, beef pancake, chicken pancake, chicken pizza, ham and cheese spaghetti and rondelli. From them, the most critically contaminated mixed preparation was the chicken pancake from Restaurant 17, which was contaminated by *Coliforms* at 45°C and also *Staphylococcus coagulasis positive*.

In order to administer the checklist in the restaurants with contaminated samples, the intervention of the Vigilância Sanitária Municipal program was necessary. When the owners of these establishments were informed about the microbiological analysis results, they were also informed about the need to assess the hygiene conditions of their restaurants. However, Restaurant 17 was not evaluated by the checklist because the establishment was closed down during the research period.

Table 2 shows the results of the checklists administered to the five remaining restaurants whose samples did not pass the microbiological standards established by the Resolution nº 12/2001. The following critical-item Non-Conformities were found: a) premises and layout – most of the restaurants (80%) did not have basins for washing hands, neutral toilet soap, aseptic products, paper towels and trash cans with pedals; b) hygiene – non-observation of the disinfection stages of food preparation was encountered in 80% of the restaurants; c) handling (manipulation) – 60% of the restaurants had staff with incomplete uniforms, 80% had inadequate procedures for personal and hand hygiene, inadequate work practices were observed in 60%, and none of the restaurants provided an achievement program for the food handlers; d) supplier and raw material quality control – 40% of the restaurants with contaminated

**Table 2.** Results of the checklist administered to the five restaurants which had contaminated samples of mixed-food preparations (excluding non-applicable items)

Aspects Evaluated	Total number of items evaluated	Restaurant 05 <sup>b</sup>		Restaurant 06 <sup>ab</sup>		Restaurant 11 <sup>ab</sup>		Restaurant 14 <sup>ab</sup>		Restaurant 15 <sup>a</sup>	
		C <sup>1</sup>	NC <sup>2</sup>	C <sup>1</sup>	NC <sup>2</sup>	C <sup>1</sup>	NC <sup>2</sup>	C <sup>1</sup>	NC <sup>2</sup>	C <sup>1</sup>	NC <sup>2</sup>
Layout and installations	32	27 (84.4%)	5 (15.6%)	16 (50%)	16 (50%)	16 (50%)	16 (50%)	22 (68.8)	10 (31.2%)	15 (46.9)	17 (53.1)
Equip/ furniture/ appliances	1	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Hygiene	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	7 (87.5%)	1 (12.5%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	4 (50%)	4 (50%)
Food handler	16	14 (87.5%)	2 (12.5%)	8 (50%)	8 (50%)	3 (18.8%)	13 (81.2%)	6 (37.5%)	10 (62.5%)	3 (18.8%)	13 (81.2%)
Supply/ raw materials	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	1 (16.7%)	5 (83.3%)	3 (50%)	3 (50%)	1 (16.7%)	5 (83.3%)
Storage	18	18 (100%)	0 (0%)	10 (55.6%)	8 (44.4%)	5 (27.8%)	13 (72.2%)	7 (38.9%)	11 (61.1%)	8 (44.4%)	10 (55.6%)
Pre-preparation *	9	8 (88.9%)	0 (0%)	3 (33.3%)	4 (44.4%)	4 (44.4%)	4 (44.4%)	5 (55.6%)	3 (33.3%)	4 (44.4%)	4 (44.4%)
Preparation **	9	8 (88.9%)	1 (11.1%)	6 (66.7%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)	2 (22.2%)	6 (66.7%)	1 (11.1%)	8 (88.9%)
Self-service counter	7	7 (100%)	0 (0%)	3 (42.9%)	4 (57.1%)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)	6 (85.7%)
Use of leftovers	4	4 (100%)	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	3 (75%)
Collection of samples	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
Use of GP manual	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>99 (88.4%)</b>	<b>12 (10.7%)</b>	<b>59 (52.7%)</b>	<b>51 (45.5%)</b>	<b>40 (35.7%)</b>	<b>71 (63.4%)</b>	<b>53 (47.3%)</b>	<b>57 (50.9%)</b>	<b>39 (34.8%)</b>	<b>72 (64.3%)</b>

<sup>1</sup> = Conformity, <sup>2</sup> = Non-Conformity.

\*The aspect of 'Pre-preparation' had one item that was not applicable in Restaurants 5, 11, 14 and 15, and two items in Restaurant 6.

\*\*The aspect of 'Preparation' had one item that was not applicable in Restaurant 14.

Different letters in the same line indicate statistically significant differences among the restaurants ( $p \leq 0.05$ ).

samples did not qualify the supplier as to product quality and 80% did not inspect the products on reception; e) storage – only one of the establishments had thermometers in their refrigeration equipment, and checked the expiry dates of the products; f) production (pre-preparation stages, food preparation and display) – it was observed that none of the restaurants used thermometers to control food temperature, and only one controlled raw-material exposure time at room temperature and the ready-made product exposure time on the self-service counter; g) the utilization of leftovers and the use of a Manual of Good

Practices – 40% of the restaurants monitored the use of leftovers. However, none of them collected menu samples or possessed a Manual of Good Practices.

For the issue of pre-preparation of food, Restaurant 5 followed all the GP criteria. In the final preparation stage and during the display of the ready-made products, the rate of Non-Conformity also was the lowest.

Restaurant 15, which had two samples contaminated by *Coliforms* at 45°C, was the establishment that showed the greatest rate of Non-Conformity (64.3%). In Restaurant 5, despite having the lowest rate of

**Table 3.** Non-Conformity results for critical items in the restaurants that had contaminated samples

Aspects evaluated	Total number of critical items evaluated	Number of Non-Conforming critical items				
		Restaurant 5 <sup>b</sup>	Restaurant 6 <sup>ab</sup>	Restaurant 11 <sup>a</sup>	Restaurant 14 <sup>a</sup>	Restaurant 15 <sup>a</sup>
Layout and installations	19	4 (21.1%)	11 (57.9%)	12 (63.2%)	8 (42.1%)	11 (57.9%)
Equip/ furniture/ appliances	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Hygiene	4	1 (25%)	1 (25%)	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)
Food handler	11	1 (9.1%)	6 (54.5%)	9 (81.8%)	6 (54.5%)	9 (81.8%)
Supply/ raw materials	2	0 (0%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	2 (100%)
Storage	9	0 (0%)	5 (55.6%)	8 (88.9%)	6 (66.7%)	6 (66.7%)
Pre-preparation	4	0 (0%)	3 (75%)	2 (50%)	2 (50%)	2 (50%)
Preparation	4	1 (25%)	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)
Self-service counter	6	0 (0%)	3 (50%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
Use of leftovers	2	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Collection of samples	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Use of GP manual	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>9 (14.1%)</b>	<b>35 (54.7%)</b>	<b>49 (76.6%)</b>	<b>39 (60.9%)</b>	<b>47 (73.4%)</b>

Different letters in the same line indicate statistically significant differences among the restaurants ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 4.** Non-conformity results obtained through checklist administration in Restaurant 3 before (checklist 1) and nine months after (checklist 2) Good Practices training (excluding non-applicable items)

Aspects Evaluated	Total number of items evaluated	Number of critical items evaluated	Checklist 1 <sup>a</sup>		Checklist 2 <sup>a</sup>	
			Total number of Non-Conforming items	Number of Non-Conforming critical items	Total number of Non-Conforming items	Number of Non-Conforming critical items
Layout and installations	32	19	13 (40.6%)	9 (47.4%)	13 (40.6%)	7 (36.8%)
Equipment/ furniture/ appliances	1	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Environmental hygiene/ appliances	8	4	6 (75%)	4 (100%)	4 (50%)	3 (75%)
Food handler	16	11	7 (43.8%)	3 (27.3%)	7 (43.7%)	4 (36.4%)
Supplier and raw material control	6	2	3 (50%)	0 (0%)	3 (50%)	0 (0%)
Storage	18	9	13 (72.2%)	6 (66.7%)	10 (44.5%)	4 (44.4%)
Pre-preparation*	9	4	6 (66.7%)	2 (50%)	2 (22.2%)	2 (50%)
Preparation*	9	4	6 (66.7%)	3 (75%)	6 (66.7%)	3 (75%)
Self-service counter	7	6	7 (100%)	6 (100%)	6 (86.7%)	5 (83.3%)
Use of leftovers	4	2	4 (100%)	2 (100%)	3 (75.0%)	2 (100%)
Collection of samples	1	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Use of GP manual	1	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>64</b>	<b>67 (59.8%)</b>	<b>37 (57.8%)</b>	<b>56 (50%)</b>	<b>32 (50%)</b>

<sup>a</sup>The aspects of 'Pre-preparation' and 'Preparation' had one item that was not applicable for the 'Total number of items evaluated' field in all of the restaurants. Different letters in the same line indicate statistically significant differences between the checklists ( $p \leq 0.05$ ).



Non-Conformity (10.7%), one of the samples was found to be contaminated by *Coliforms* at 45°C. With the aim of confirming these descriptive data, an ANOVA was performed on the Non-Conformities data presented in Table 2. A significant result ( $p=0.0424$ ) was obtained in the F-Snedecor test, and the differences among the restaurants were revealed by Tukey tests, whose results are identified by letters in the table.

None of the five restaurants evaluated by the checklist showed 100% Conformity for the 64 critical items. Restaurant 5, which had the lowest Non-Conformity rate of the five restaurants for critical items, did not conform to nine (14.1%) of these items. Restaurant 11, which had the highest rate of Non-Conformity, did not conform to 49 (76.6%) of the 64 items. High Non-Conformity rates were observed for the critical items relating to cleaning, food handlers and storage criteria (Table 3). A significant result ( $p=0.0006$ ) was found when an ANOVA was applied to this data for the F-Snedecor test. Again, the differences among the restaurants are identified by letters in the table.

From the 18 restaurants studied, only Restaurant 3 allowed GP training, although none of its samples were found to be contaminated. Corrective actions were recommended for the Non-Conformities reported by the checklist. A quality control team with a supervisor and monitors was also recommended to ensure the continuation of the requirements of the safety criteria established by the GP.

Nine months after the training, a second inspection was carried out and the checklist was again administered, finding that the quality control team had not been installed; food handlers had been replaced by new employees who had not received GP training and that the recommendations suggested by the action plan had not been carried out.

Table 4 shows the Non-Conformity results obtained by the checklist before and after the GP training in Restaurant 3. According to the table, the Non-Conformity rate for critical items (57.8%) obtained by the first checklist classified Restaurant 3 as being critical, and the results of the second checklist (50%) maintained the same classification. The results were submitted to an analysis of variance (ANOVA), regarding the results of the checklists as the cause of the variation. A non-statistically significant result ( $p=0.6190$ ) was obtained for the F-Snedecor test, confirming the lack of a significant improvement between the first and second administrations of the checklist.

There was a fall in the Non-Conformity rates for the aspects of hygiene, storage, pre-preparation,

distribution and use of leftovers. The other aspects assessed, i.e. premises and layout, suppliers and raw material control, preparation, collection of samples and use of a Good Practices manual remained unaltered. For the aspect of food handling, there was a small increase in Non-Conformities for the critical items, mainly for those related to appropriate work conduct and existence of continuous training in food and personal hygiene. However, even though Restaurant 3 showed a high rate of Non-conformity, it was not found to have any contaminated samples in between the administration of the first and second checklists.

## DISCUSSION

The results obtained by the microbiological analyses of mixed-food preparations from 18 restaurants indicated that the samples which were contamination by *Staphylococcus coagulans positive* and *Coliforms* at 45°C were the samples for which greater pre-preparation handling or manipulation occurred; such as, lasagna, pasta, pancakes, and chicken and mixed salads, with some of them requiring re-heating (e.g. lasagna) and others requiring refrigeration (e.g. chicken salad) before being served. To avoid foodborne diseases, food should be prepared in accordance with rigorous hygiene-control measures and kept in storage, or on the self-service counter itself, for an appropriate amount of time and at an appropriate temperature, thereby preventing the growth of pathogenic microorganisms<sup>8,12</sup>.

Although *Salmonella* sp were not found in any of the samples collected from the establishments studied, data from the state of Paraná (1999) revealed that of the 89 cases of foodborne diseases registered, 55 (61.8%) were confirmed for the microbial etiology, with 32 (35.96%) being caused by *S. aureus* and 16 (17.09%) by *Salmonella* sp<sup>3</sup>. The absence of contamination by *Salmonella* sp. may be due to the low resistance of this microorganism to temperatures above 60°C and also to the fact that the preparations did not include raw eggs or undercooked poultry meat<sup>8</sup>.

The fact that only one sample exceeded the acceptable limit for *Staphylococcus coagulans positive* is due to the use of heated food counters, used to keep the food hot while it is on display<sup>8,12</sup>.

In light of the fact that research on *Coliform* rates can be used as an indicator of hygiene conditions, providing a warning of the eventual presence of

enteropathogens<sup>12,13,14</sup>, 33.3% of the 18 restaurants studied served food that was not fit for consumption.

The negative microbial contamination results in 12 out of the 18 restaurants studied do not guarantee the quality of hygiene in the restaurants, as the Resolution n° 12/2001 only takes sanitary standards into consideration<sup>8</sup>.

For the 5 restaurants with contaminated samples can be observed that most of the evaluated items showed high rates of Non-Conformity. Praxedes<sup>15</sup> claims that the food handlers, either in themselves, or through inadequate procedures for handling food, represent a considerable source of contamination, and recommends correct hygiene practices, suitable uniforms, correct procedures during food production and care in avoiding cross contamination, among other things, as examples of what can be done to reduce the risk of foodborne diseases.

Even though the inadequate control of temperature during storage is a possible cause of food contamination<sup>12,16</sup>, it was observed that most restaurants did not control storage temperatures, and this could, therefore, have been a factor that contributed to the occurrence of contaminated samples. The control of the two variables of time and temperature during pre-preparation stages, food preparation and display is important in controlling bacterial growth, as depending on the exposure time and temperature of the food, bacterial multiplication will be faster or slower, thereby potentially increasing the risk of contamination<sup>16</sup>.

Yet more critical-item Non-Conformities were observed and none of the evaluated restaurants followed the established criteria for the appropriate use of leftovers, the collection of sample and use of a GP manual. The Manual of Good Practices describes the procedures for safe food production adopted by each establishment, is required by law and must be updated every time the company makes changes in its physical or operational structure<sup>8</sup>.

As the critical items are considered essential for the safe production of food<sup>8,17</sup>, the occurrence of contaminated samples in restaurant 5, which had the lowest Non-Conformity rate, could be due to the non-compliance with some of the items, such as: a lack of basins for washing hands, the absence of cleaning procedures for utensils, equipment and the preparation and service environments, the absence of thermometers for controlling the temperature of the foods, and the absence of a continuous training program in hygiene for the food handlers.

The microbial contamination results of the food in the restaurants studied, which typically had Non-Conformity rates of above or around 50% (Table 2), indicate that in some stages of food production, microbiological risk was not properly controlled, either in handling procedures, food temperature control or due to problems resulting from inadequate hygiene and installations. Such Non-Conformity rates indicate that these establishments have critical sanitary conditions.

The similar results found in the two evaluations carried out in Restaurant 3 (Table 4) can be explained by the non-observance of the corrective actions (recommended by the plan of action) of existing Non-Conformities, by the discontinuity of the new workers' achievement program and by the lack of a person responsible for the effective application of the GP in the company. According to Zaccarelli<sup>18</sup>, a continuous program of health education for food handlers is of great help in the implementation of quality programs such as the GP. Thus, a team should be created to keep the program and training running, and to continue observing the safety criteria established by GP.

Despite the importance of the critical items for safe food production, based on GP criteria, which are deemed essential by the govt. edict Resolution n° 216/2001 of the Ministério da Saúde<sup>5</sup>, the five establishments with contaminated samples and the restaurant that received GP training, all evaluated by the checklist, did not follow the current legislation for food production in the country. As a result of this research, it was suggested to the owners of the restaurants that they organize and administer courses or seminars for food handlers, focusing on the critical Non-Conformities. Further checklist evaluations and microbiological analyses of the contaminated preparations were also proposed, with the aim to promoting improvements in hygiene conditions and, ultimately, safer food for their consumers.

For Restaurant 3, a re-administration of the GP training for food handlers was suggested, as well as the fulfillment of the guidelines proposed in the action plan after the original checklist evaluation.

Due to the scarcity of studies on hygiene conditions in commercial restaurants and also to their importance in helping to prevent foodborne diseases, it is strongly recommended that further studies be carried out and the implementation of education programs for both food handlers and consumers how a strategy for reducing the occurrence of foodborne diseases.

---

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Vigilância Sanitária do Município de Maringá for their support and contribution in the collection of food samples from the restaurants. The authors are also grateful to the Safe Food Program for authorizing the use of the GP checklist and the didactic guidelines for training.

---

#### REFERENCES

1. Martins LL, Santos IF, Franco RM, Oliveira LAT, Bezz J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo "hot dog" comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2008; 67(3): 215-20.
2. Amson GV, Haracemiv SMC, Masson ML. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciênc Agrotec* 2006; 30(6): 1139-45.
3. Antunes F. Relação entre a ocorrência de diarreia e surtos alimentares em Curitiba-Pr [Dissertação de mestrado]. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005, 106p.
4. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra, RAE, Lima JL. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciênc Saúde Coletiva* [online] 2008; 13(5):1675-83.
5. Brasil. Resolução RDC n. 216 de 16 de setembro de 2004 do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 16 de setembro 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=12546>. A
6. Senac - Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial. Guia Passo a Passo: Implantação de Boas Práticas e Sistema APPCC. Projeto APPCC Mesa. Rio de Janeiro: Senac Press; 2002.
7. Tomich RGP, Tomich TR, Amaral CAA, Junqueira RG, Pereira AJG. Metodologia para Avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. *Ciênc Tecnol Alim* 2005; 25(1): 115-20.
8. Senac - Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial. Elementos de Apoio. Boas Práticas e Sistema APPCC. Projeto APPCC Mesa. Rio de Janeiro: Senac Press; 2001.
9. Brasil. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>.
10. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association (APHA) Press; 1992.
11. Senac - Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial. Cartilha do Manipulador de Alimentos. Projeto APPCC Mesa. Rio de Janeiro: Senac Press; 2002.
12. Faustino JS, Passos EC, Mello ARP, Araújo ALM, Souza CV, Jorge LIF et al. Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000-2006. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2007; 66(1): 26-30.
13. Santos MI, Tondo EC. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em lactário. *Rev Nutr* 2000; 13(3): 211-22.
14. Rodrigues KL, Gomes JL, Conceição RCS, Brod CL, Carvalhal JB, Aleixo JAG. Condições higiênico-sanitárias no comércio de ambulante de alimentos em Pelotas. *Ciênc Tecnol Alim* 2003; 23(3): 447-52.
15. Praxedes PCG. Aspectos da qualidade higiênico-sanitária de alimentos consumidos e comercializados na comunidade São Remo, São Paulo, Capital. [Dissertação de mestrado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2003, 120p.
16. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed Press; 2002.
17. Bryan FL. Prevention of foodborne diseases in food service establishments. *J Environ Health* 1979; 41(4): 198-206.
18. Zaccarelli E, Coelho HDS, Silva MEP. O jogo, como prática educativa no treinamento para controle higiênico-sanitário, em unidades de alimentação e nutrição. *Hig Alim*; 14(70): 23-6.

Hygienic conditions of minimally-processed watercress, lettuce and cabbage, and fresh-cut lettuce

## Condições higiênico-sanitárias de agrião, alface e repolho minimamente processados e alface *in natura*

RIALA6/1193

Evelyn RAPANELLO<sup>1</sup>, Terumi Oyama FUZIHARA<sup>1\*</sup>, Silene Maria NUNES<sup>1</sup>, Vilma dos Santos Menezes Gaiotto DAROS<sup>1</sup>, Lúcia Vannucci SAVIGNANO<sup>1</sup>

\*Corresponding author: Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santo André, Avenida Ramiro Colleoni, 240, Vila Dora, Santo André, SP, Brasil, CEP 09040-160, e-mail: fuzihara@uol.com.br

<sup>1</sup>Seção de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santo André, SP, Brasil.

Recebido: 02.09.2008 – Aceito para publicação: 10.12.2008

### ABSTRACT

With the purpose of assessing the hygienic conditions of package ready-to-eat vegetables sold in the ABC region - SP, 20 samples of each type of minimally-processed vegetables, watercress, lettuce and cabbage were analyzed, in addition to 25 fresh-cut lettuce samples. Coliforms and *Escherichia coli* were analyzed by means of the most probable number (MPN) technique, and *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* by the conventional culture technique. Centrifugal-flotation technique was carried out for enteroparasites detection. Fecal coliforms MNP values higher than  $10^2/g$  were observed in 60.0% of cabbage, 50.0% of watercress, and 20.0% of lettuce minimally-processed samples. In 48.0% of fresh-cut lettuce samples, the MPN values of fecal coliforms was higher than  $2 \times 10^2/g$ . *Escherichia coli* was evidenced in 45.0%, 30.0% and 20.0% of watercress, cabbage and fresh-cut lettuce samples, respectively. *Salmonella* was isolated from 5.0% and 4.0% of watercress and fresh-cut lettuce samples, respectively, and *Yersinia enterocolitica* was found on 5.0% of cabbage samples. Enteroparasites were detected on 7.1% of watercress and on 20.0% of fresh-cut lettuce samples. Good manufacturing practices implementation on whole vegetable-produce chain is relevant, in order to assure the availability of safe products to population

**Key words.** vegetables, minimally processed, hygienic conditions, pathogenic bacteria, enteroparasites.

### RESUMO

Com o intuito de avaliar as condições higiênicas das hortaliças empacotadas e prontas para o consumo, foram analisadas 20 amostras de cada tipo dessas hortaliças - agrião, alface e repolho minimamente processadas e, também, 25 amostras de alface *in natura*. A determinação de coliformes e *Escherichia coli* foi realizada por meio de técnica do número mais provável (NMP). Foi utilizada a técnica convencional de cultura para efetuar a pesquisa de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, e a análise parasitológica pela técnica de centrifugo-flutuação. O valor de NMP de coliforme fecal acima de  $10^2/g$  foi encontrado em 60,0% das amostras de repolho, em 50,0% de agrião e em 20,0% de alface minimamente processadas. Em 48,0% das amostras de alface *in natura*, o valor de NMP de coliformes fecais foi acima de  $2 \times 10^2/g$ . *Escherichia coli* foi evidenciada em amostras de agrião, repolho minimamente processados e em alface *in natura*, respectivamente na proporção de 45,0%, 30,0% e 20,0%. *Salmonella* foi isolada em 5,0% de amostras de agrião e em 4,0% de alface *in natura*; e em 5,0% de amostras de repolho foi detectada *Yersinia enterocolitica*. Os enteroparasitas foram detectados em 7,1% de amostras de agrião e em 20,0% de alface *in natura*. Os resultados do presente estudo mostram a necessidade de implantar as boas práticas de manufatura de hortaliças em todas as etapas de produção, visando obter produtos mais seguros para saúde pública.

**Palavras-chave.** hortaliças, minimamente processadas, condições higiênicas, bactérias patogênicas, enteroparasitas.

## INTRODUCTION

The packaged minimally-processed vegetables are those undergone to minimally- processing operations and to be offered to the consumers in a practical and attractive formats. The minimally-processing procedures involve selection, classification, cleaning, washing, sanitation, peeling, cutting, packing, and storage<sup>1</sup>. Due to the fact of being highly perishable, it is recommended to store the minimally-processed vegetables at below 5°C after being packed in a specific plastic film and sealed, in order to maintain O<sub>2</sub> absorption and CO<sub>2</sub> production balance. The permeability to the water vapor produced by condensation inside the package provides optimal conditions for inducing growth of microorganisms<sup>2</sup>.

The minimally-processed vegetables were introduced in Brazil in the 90s, and they become well-received products due to the advantages of the way they are offered to consumers as cleaned and packed products, besides of convenience in saving time in meals preparation and in minimizing waste<sup>3</sup>.

Microbiota in fresh-cut vegetables is diverse, but it usually does not include pathogenic microorganisms to man. Nonetheless, at some points at the vegetable produce chain some incorrect procedures have been put into practice, such as the use of human or animal feces as fertilizer, and the employment of improper irrigation water from rivers and creeks that receive untreated domestic sewer, which can contaminate the vegetables. And these practices increase the risk to diseases caused by pathogenic bacteria, parasites and viruses<sup>4</sup>. Also, pathogens can be transmitted to the products handled by infected worker, in addition to the used vehicles, insects and domestic animals which are crucial sources of contamination<sup>5</sup>. Therefore, the fresh-cut vegetables that are eaten raw have been considered as a potential source in transmitting pathogenic agents related to food-borne disease.

Concurrently to the rise of popularity in consuming minimally-processed vegetables, there is an increase of the risk for microorganisms contamination derived from inadequate handling, inappropriately cleaned or sanitized equipments, which contribute to produce high counts of spoilage and/or pathogenic microorganisms<sup>6</sup>. According to Beuchat<sup>7</sup>, the food-borne disease outbreaks associated with raw fruits and vegetables consumption were very common highly prevalent in the USA during the last decade. These outbreaks occurred on account of

the *per capita* growth in consuming raw and minimally-processed fruits and vegetables, in the international trade expansion, and also owing to the increasing number of immunosuppressed consumers.

Since the minimally-processed vegetables consumption has also been increasing in Brazil, and because of the lack of information on the quality of these products, the present study evaluated the hygienic conditions of minimally-processed watercress, lettuce and cabbage, and fresh-cut lettuce, searching for the total and fecal coliforms, *Escherichia coli*, enteroparasites, and pathogenic bacteria, such as *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*.

## MATERIAL AND METHODS

### ■ Samples

A total of 60 samples, being 20 samples of each type of the minimally-processed vegetables - watercress, lettuce and cabbage were collected in the ABC region, SP. The minimally-processed vegetables were ready-to-eat, packed in a plastic film, and stored at refrigerated temperatures. Sampling units were made up of two 350g-package of each vegetable. Twenty-five conventional fresh-cut lettuce samples were also collected and analyzed, being the sampling unit one lettuce head, no matter the weight or size.

The vegetables samples were collected from July 2005 to October 2006 from supermarkets and vegetable dealers in the ABC region, SP. The vegetables samples were taken to the laboratory in their original packages, and they were kept under refrigeration until the moment of analysis, which occurred in a maximum of 24 hours after being collected.

### ■ Samples processing

Twenty-five g of each sample were homogenized in 225 mL of 0.1% peptone water, to get a 10<sup>-1</sup> dilution, which was used to prepare the serial and sequential ten-fold dilutions with the same diluent solution.

### ■ Total and fecal coliforms, and *E. coli* counts

The microorganisms counts were carried out using the most probable number procedure (MPN), following the methodology described by Hitchins et al.,1992<sup>8</sup>. Presumptive test for total coliforms was carried out on lauryl sulphate broth (BD-Sparks, USA), and the confirmatory testing was performed on brilliant green bile



broth (BD-Sparks, USA), both incubated at 35°C for 24-48h. *Escherichia coli* broth (BD-Sparks, USA) was used to determine the fecal coliforms and examined after 24-48h at 45°C. *E. coli* was detected by culturing the positive-fecal coliform tubes onto Levine agar (BD-Sparks, USA) and incubated at 35°C for 24h. Five nucleated colonies, with or without metallic sheen, were subcultured on tryptic soy agar (Oxoid-Basingstone, England) during 24h at 35°C. The presence of *E. coli* was confirmed by means of Gram staining, lactose broth, and IMViC tests (indole, methyl red, Voges Proskauer and citrate). The following criteria determined the positive *E. coli* strain: Gram-negativity, lactose-fermenting bacilli, IMViC patterns (++-- ) and (-+--).

#### ■ *Salmonella*.

*Salmonella* contamination was investigated according to Andrews et al, 1992<sup>9</sup>. Twenty-five g of samples were pre-enriched in 1% buffered peptone water and incubated at 35°C for 24h. Selective enrichment was carried out on tetrathionate and Rappaport Vassiliadis broths (Oxoid-Basingstone, England), and incubated during 24-48h at 43°C; and the isolation was done on bismuth sulfite agar (Oxoid-Basingstone, England) and brilliant green agar (Oxoid-Basingstone, England) at 35°C for 24h. The presumptive identification was carried out triple sugar iron agar (Oxoid-Basingstone, England) and lysine iron agar (Oxoid-Basingstone, England). *Salmonella*-suggestive strains were investigated by biochemical tests using API 20E (BioMérieux Marcy l'Etoile, France), and subtyped by seroagglutination assay by using polyvalent flagellar and somatic antisera. *Salmonella* serotyping was performed at Bacteriology Department of Instituto Adolfo Lutz - Central Laboratory in São Paulo, SP.

#### ■ *Listeria monocytogenes*

A 25g-sample aliquot was homogenized in buffered *Listeria* enrichment broth (Oxoid-Basingstone, England) and incubated for 24-48h at 30°C. Bacteria isolation was carried out on *Listeria* selective agar - Oxford formulation (Oxoid-Basingstone, England) incubated at 35°C for 48h; and the typical colonies were isolated on tryptic soy agar with 0.6% yeast extract incubating at 30°C for 24h. Biochemical characterization was based on the following assays: catalase production,  $\beta$ -hemolysis production on 4% horse blood agar, motility on semi-solid agar, and API for *Listeria* (BioMérieux Marcy l'Etoile, France). *Listeria monocytogenes* contamination on analyzed vegetables was investigated according to Hitchins, 2003<sup>10</sup>.

#### ■ *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* contamination on analyzed vegetables was determined according to Weagan et al., 2003<sup>11</sup>.

A 25g-sample aliquot was homogenized in peptone sorbitol bile broth and then divided into two equal parts: one was enriched at 7°C during the period from 10 to 21 days, and the second portion at 25°C from 2 to 7 days. After incubation, 1 mL of each enriched portion was decontaminated by adding 9mL of 0.5% KOH in 0.5% saline. The bacteria isolation was carried out on MacConkey agar (Oxoid-Basingstone, England) at 25°C for 48h, and on *Yersinia* selective agar (Oxoid-Basingstone, England) at 30°C during 24h. Five typical colonies were cultured onto triple sugar iron agar, bile esculin agar, Christensen urea agar, and tryptic soy agar, incubating for 48h at 25°C. H<sub>2</sub>S or other gas non-producing-strains on triple sugar iron agar and also either positive or negative saccharose, positive urease, and positive or negative esculin were analyzed by biochemical testing using API 20E.

#### ■ Enteroparasites

Each vegetable sample was washed down with a brush using 300mL of neutral detergent (10mL Extran MA diluted in 2,000 mL of saline). The washing liquid was filtered in gauze, transferred to a conical glass and left to rest for 24 hours. Then, the supernatant was discarded and the sediment was homogenized. A part of it ( $\approx$ 10ml) was poured in centrifuge tubes for processing centrifugal-floation technique using zinc sulfate; the remaining portion was employed for sedimentation technique. Enteroparasites contamination on analyzed vegetables was investigated following the methodology described by Oliveira & Germano, 1992<sup>12</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

Of 20 minimally-processed watercress and cabbage samples, seven (35.0%) presented total coliform counts higher than 10<sup>6</sup>/g, and 10.0% (2/20) of minimally-processed lettuce samples showed MPN of total coliforms ranging from 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup>/g (Table 1). Although the Brazilian regulation<sup>13</sup> for food products does not include the total coliform counts in ready-to-eat vegetables, Caruso and Camargo<sup>14</sup> showed that MPN of total coliforms higher than 10<sup>6</sup>/g, turning the vegetables inadequate for human consumption due to organoleptic changes, loss in nutritional value and risks to consumers health.

In addition, the occurrence of total coliforms is valuable indicators for processing conditions. The high counts of these microorganisms suggest an inadequate food processing, and/or recontamination after being processed. The most frequent causes of microorganisms contamination on minimally-processed vegetables are the lack of quality of raw material, the inaccurate cleaning and sanitization of used equipment and utensils, and the inadequate product handling<sup>15</sup>.

Table 1 also indicates that 60.0% of the cabbage samples, 50.0% of the watercress samples and 20.0% of the minimally-processed lettuce samples demonstrated MPN of fecal coliforms higher than 10<sup>2</sup>/g. The Resolution RDC n°12<sup>13</sup> determines a tolerance of up to 10<sup>2</sup>/g of the product for fecal coliforms; therefore, according to the observed results a clear nonconformity with the regulation was evidenced. The results found in the present study were lower than those reported by Fröder et al.<sup>16</sup>, in São

Paulo. These investigators analyzed different types of minimally-processed vegetables, and observed that 84.6% of the watercress samples and 61.0% of the lettuce samples showed higher than 10<sup>2</sup> fecal coliforms/g. López et al.<sup>17</sup>, in Chile, reported the adequate hygienic conditions in 100% of analyzed minimally-processed cabbage samples, being MPN of fecal coliforms lower than 3/g.

According to Brackett et al.<sup>18</sup>, the occurrence of fecal coliforms is not considered to be an indicator of pathogenic bacteria derived from gastrointestinal tract. Some species, particularly *Klebsiella*, belonging to the fecal coliforms group, take part in the microbiota on fresh-cut vegetables. The presence of these microorganisms may produce positive results for fecal coliforms. *E. coli* is the unique valid indicator for fecal contamination. *E. coli* was isolated from 30.0% and 45.0% of the cabbage and watercress samples, respectively, although its occurrence was not detected on minimally-processed lettuce (Table

**Table 1.** Class intervals/g for the most probable number of total and fecal coliforms on minimally-processed cabbage, watercress and lettuce, and on fresh-cut lettuce samples collected from 2005 to 2006 in the ABC region, SP

Class intervals/g	mp cabbage			mp watercress			mp lettuce			fresh-cut lettuce		
	TC N° (%)	FC N° (%)	<i>E.coli</i> N° (%)	TC N° (%)	FC N° (%)	<i>E.coli</i> N° (%)	TC N° (%)	FC N° (%)	<i>E.coli</i> N° (%)	TC N° (%)	FC N° (%)	<i>E.coli</i> N° (%)
0 - 10	-	7 (35.0)	14 (70.0)	-	10 (50.0)	12 (60.0)	2 (10.0)	16 (80.0)	20 (100.0)	1 (4.0)	9 (36.0)	20 (80.0)
10 - 10 <sup>2</sup>	-	1 (5.0)	-	-	-	1 (5.0)	3 (15.0)	-	-	-	4 (16.0)	-
10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	1 (5.0)	4 (20.0)	2 (10.0)	1 (5.0)	6 (30.0)	6 (30.0)	5 (25.0)	3 (15.0)	-	2 (8.0)	2 (8.0)	2 (8.0)
10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	4 (20.0)	2 (10.0)	1 (5.0)	4 (20.0)	1 (5.0)	-	4 (20.0)	1 (5.0)	-	5 (20.0)	2 (8.0)	-
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	5 (25.0)	5 (25.0)	2 (10.0)	5 (25.0)	3 (15.0)	2 (10.0)	4 (20.0)	-	-	12 (48.0)	6 (24.0)	2 (8.0)
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	3 (15.0)	-	-	3 (15.0)	-	-	2 (10.0)	-	-	3 (12.0)	2 (8.0)	1 (4.0)
> 10 <sup>6</sup>	7 (35.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	7 (35.0)	-	-	-	-	-	2 (8.0)	-	-

mp = minimally-processed, TC = total coliforms, FC = fecal coliforms, cabbage = 20 samples, watercress = 20 samples, lettuce = 20 samples; fresh-cut lettuce = 25 samples.

1). The maximum value of most probable number of *E. coli* observed on cabbage and watercress samples were  $>1.1 \times 10^6/g$  and  $9.3 \times 10^4/g$ , respectively (data not shown).

As for fresh-cut lettuce, 48.0% (12/25) of samples showed fecal coliform counts higher than  $2 \times 10^2/g$ . These results indicate the inadequacy in the vegetable hygienic condition, according to the Decree 12.486<sup>19</sup>. The values detected in the present study were higher than those reported by Takayanagui et al.<sup>20</sup>, in Ribeirão Preto, and by Simões et al.<sup>21</sup>, in Campinas, wherein the most probable number of fecal coliforms above  $2 \times 10^2/g$  was found on 17.0% and 19.0% of analyzed fresh-cut vegetable samples, respectively. The occurrence of *E. coli* was observed on 20.0% (5/25) of fresh-cut lettuce samples (Table 1), and the maximum counts were  $1.1 \times 10^5/g$  of the product (data not shown).

None of the minimally-processed vegetables or fresh-cut lettuce harbored *L. monocytogenes* (Table 2), although other species were isolated, such as: *L. innocua* from one watercress sample, and *L. seeligeri* and *L. innocua* from some samples of fresh-cut lettuce. *L. innocua* is not considered to be pathogenic to human, and listeriosis caused by *L. seeligeri* is extremely rare in humans<sup>10</sup>. Similar data were reported in United Kingdom by Sagoo et al.<sup>22</sup>, these investigators did not detect *L. monocytogenes*, but isolated other *Listeria* species from 0.2% of analyzed minimally-processed vegetables samples: *L. innocua* from watercress and *L. seeligeri* from raddish. In Brazil, Fröder et al.<sup>16</sup>, isolated *L. monocytogenes* and *Listeria spp* from 0.6% and 1.7% of minimally-processed vegetables,

respectively, whereas De Curtis et al.<sup>23</sup>, in Venezuela, detected *L. monocytogenes* from 30.0% of minimally-processed vegetables samples.

*Yersinia enterocolitica* was isolated from 5.0% (1/20) of cabbage samples (Table 2), and other *Yersinia* species were detected on three varieties of minimally-processed vegetables samples: *Y. frederiksenii* (from minimally-processed cabbage and lettuce), *Y. intermedia* (from minimally- processed lettuce), and *Y. kristensenii* (from watercress). Among the isolated species, *Y. enterocolitica* is the only one considered to be potentially pathogenic to humans, and yersinosis outbreaks associated with the consumption of foodstuffs contaminated with this bacterium were reported elsewhere<sup>24,25</sup>. Pingulkar et al.<sup>26</sup> did not detect *Y. enterocolitica* in India, but *Yersinia sp* was isolated from 20.0% of ready-to-eat vegetables samples.

Investigation on both *Yersinia enterocolitica* and *L. monocytogenes* are required for foodstuffs stored under refrigeration due to the psychrotrophic characteristics of these organisms<sup>27</sup>.

*Salmonella* was isolated from 5.0% (1/20) of watercress samples and 4.0% (1/25) of fresh-cut lettuce samples, which showed lower than 10 fecal coliforms/g (Table 2). Therefore, these vegetables are considered inadequate for consumption by reason of *Salmonella* detection on 25g of the product, according to the current regulation. These results were similar to those reported by Fröder et al.<sup>16</sup> and Takayanagui et al.<sup>20</sup>, wherein *Salmonella sp* was isolated from  $\approx 3.0\%$  of minimally-processed

**Table 2.** Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* on minimally-processed cabbage, watercress and lettuce, and on fresh-cut lettuce samples collected from 2005 to 2006 in the ABC region, SP

Type of vegetable	N° (%) of positive samples for			
	Total n° of samples	<i>L.monocytogenes</i> in 25g	<i>Y.enterocolitica</i> in 25g	<i>Salmonella</i> in 25g
mp cabbage	20	-	1 (5.0)	-
mp watercress	20	-	-	1 (5.0)
mp lettuce	20	-	-	-
Fresh-cut lettuce	25	-	-	1 (4.0)

mp = minimally-processed.

vegetables and fresh-cut vegetables samples, respectively. On the other hand, in the study conducted in Chile by López et al.<sup>17</sup>, none of the analyzed minimally-processed vegetables samples harbored *Salmonella*.

*Salmonella* serotypes identified in the present study were *S. enteritidis*, isolated from watercress and *S. panama* from fresh-cut lettuce samples. The bacteria genus *Salmonella* continue to be the main etiological agents of food-borne disease outbreaks. In 2005, *Salmonella* was responsible for 39.0% of food-borne disease outbreaks, being *S. Enteritidis* as the second mostly prevalent serotype in 10 States of the Unites States of America<sup>28</sup>.

*Salmonellae*, as Gram negative bacteria, are easily eliminated by using low concentrations of free chlorine. Nonetheless, on some occasions these microorganisms are unsuccessfully eliminated from pre-contaminated vegetables. Chlorine efficacy as a disinfectant depends on the concentration, pH, temperature, time of exposure, and the growth phase of the pre-existent pathogen<sup>29</sup>. Other factors also abrogate the lethal effect of hypochlorite on microorganisms, as the hydrophobic nature of fat droplets covering the vegetable surface<sup>30</sup>, and the vegetable structure, which may prevent the contact between the sanitizing agent and the pathogens<sup>7</sup>.

Parasitological analyses were carried out in 70.0% of each minimally-processed vegetables variety, and in 100% of fresh-cut lettuce samples.

Results of these analyses are shown in Table 3; 7.1% (1/14) of watercress samples were contaminated with enteroparasite eggs, as from *Ascaris lumbricoides*, but no enteroparasite was detected on two other minimally-processed vegetables varieties. On 14.3% (2/14) of watercress samples and on 7.1% (1/14) of cabbage samples, contaminants as mites and nematode larvae were detected. Hence, 21.4% of watercress samples and 7.1% of cabbage samples did not comply with Decree SVS 326/97<sup>31</sup>, considering the presence of unusual biological matters, either harmful or harmless to human health on the processed foodstuffs. Only the lettuce sample was negative for both enteroparasites and biological contaminants, among the three minimally-processed vegetables varieties analyzed in the present study. This fact might be in part correlated to the vegetable structure, as the large and smooth leaves of lettuce could be favored by the cleaning procedure and by the action of the sanitizing agent on the vegetable.

Twenty percent (5/25) of fresh-cut lettuce samples were contaminated with enteroparasites as *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides* eggs, *Giardia lamblia* and *Entamoeba coli* cysts (Table 3), which indicate the occurrence of fecal contamination from human and/or animal origin, and these findings are important for public health, excepting *Entamoeba coli*, for being considered as no pathogenic for man<sup>32</sup>. Even so, the presence of this

**Table 3.** Number and percentage of positive samples for enteroparasites and contaminating agents on minimally-processed cabbage, watercress and lettuce, and on fresh-cut lettuce collected from 2005 to 2006 in the ABC region, SP

Type of vegetable	N° (%) of positive samples			Total n° of positive samples
	Total n° of samples	Enteroparasites	Biological contaminants	
mp cabbage	14	-	1 (7.1)	1 (7.1)
mp watercress	14	1 (7.1)	2 (14.3)	3 (21.4)
mp lettuce	14	-	-	-
Fresh-cut lettuce	25	5 (20.0)	4 (16.0)	9 (36.0)

mp = minimally-processed, enteroparasites= *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides* eggs, *Giardia lamblia* and *Entamoeba coli* cysts, and biological contaminants = mites, nematode larvae.

protozoan is relevant when the fecal coliform counts are high, as observed in the present study. Silva et al.<sup>33</sup> and Soares et al.<sup>34</sup> have recently reported the high rates of enteroparasites on analyzed fresh-cut lettuces samples.

The results found in the present study show the poor hygienic conditions of the minimally-processed vegetables, evidenced by high rate of fecal and total coliform populations, and also by detecting *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, pathogenic parasites and biological contaminants. For that reason, the implementation on good manufacturing practices is crucial, from the vegetable cultivation to each stage of minimally processing, including packing and refrigeration, in order to prevent cross-contamination and multiplication of microorganisms during production and storage.

As for fresh-cut vegetables, especially those receiving no heat treatment before consumption, the quality will be improved if some measures are assumed by means of educational programs directed to agriculturists, combined with periodically monitoring the water used for irrigation procedures.

Good manufacturing practices implementation on the whole vegetable-produce chain is relevant, in order to identify and control the factors for preventing contamination and restraining microorganisms growth, and to assure the availability of safe products to population. In addition, hygienic status, appropriate storage and transportation conditions are crucial factors for extending the vegetables shelf life and safety.

## REFERENCES

1. Chitarra MIF. Processamento mínimo de frutos e hortaliças. Viçosa. Centro de produções técnicas; 1998. 88p
2. Maistro LC. Alface minimamente processada: uma revisão. *Rev Nutr* 2001; 14(3): 219-24.
3. Pires EF, Shinohara NKS, Freitas F, Silveira KC, Perez A. Estabilidade de vegetais minimamente processados. *Hig Aliment* 2006; 20(147): 30-3.
4. Beuchat LR, Ryu JH. Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(4): 459-64.
5. Wei CI, Huang TS, Kim JM, Lin WF, Tamplin ML, Bartz JA. Growth and survival of *Salmonella* monteideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *J Food Prot* 1995; 58: 829-36.
6. Bolin HR, Stafford AC, King A, Huxsoll C. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. *J Food Sci* 1977; 42: 1319-21.
7. Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect* 2002; 4: 413-23.
8. Hitchins AD, Hartman PA, Todd ECD. Coliforms-*Escherichia coli* and its toxins. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 3<sup>rd</sup> ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor; 1992. p. 325-69.
9. Andrews WH, Bruce VR, June G, Satchell F, Sherrod P. *Salmonella*. In: *Bacteriological analytical manual* 7<sup>th</sup> ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists; 1992. p. 51-69.
10. Hitchins AD. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: *Bacteriological analytical manual (BAM) chapter*, [online] 2003 Jan [cited 2004 Jan 16]. Available from: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/ebam-10.html>.
11. Weagant SD, Feng P, Stanfield JT. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. I: *Bacteriological analytical manual* 7<sup>th</sup> ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists; 1992. p. 95-109.
12. 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 Públ* 1992; 26(4): 283-9.
13. Brasil. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União; Poder Executivo*, 10 janeiro 2001. Seção 1, p. 45-53.
14. Caruso JGB, Camargo R. Microbiologia de alimentos. In: Camargo R editor. *Tecnologia dos produtos agropecuários-alimentos*. São Paulo: Ed. Nobel; 1984. p. 35-49.
15. Landgraf M. Microrganismos indicadores. In: Franco BDGM, Landgraf M, editores. *Microbiologia dos alimentos* 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Ed. Atheneu; 1996. p. 27-31.
16. Fröder H, Martins CG, De Souza KL, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. *J Food Prot* 2007; 70(5): 1277-80.
17. López VL, Romero RJ, Duarte FF. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección em vegetales petrozados expendidos em Chile. *Arch Latinoam Nutr* 2003; 53(4): 383-8.
18. Brackett RE, Splittstoesser DF. Fruits and vegetables. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 3<sup>rd</sup> ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor; 1992. p. 919-27.
19. São Paulo. Decreto Estadual nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Aprova normas técnicas relativas a alimentos e bebidas. In: *Código Sanitário do Estado de São Paulo* 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: EDIPRO; 2001. p.152-297.
20. Takayanagui OM, Febrônio LHP, Bergamini AM, Okino MHT, Castro e Silva AAMC, Santiago R et al. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 37-41.
21. Simões M, Pisani B, Marques EGL, Prandi MAG, Martini MH, Chiarini PFT et al. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. *Braz J Microbiol* 2001; 32: 331-3.
22. Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33(6): 434-9.



23. De Curtis ML, Franceschi O, De Castro N. *Listeria monocytogenes* vegetales mínimamente procesados. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52(3): 282-8.
24. Aluisio CCG, Lanier JM, Chappel MA. *Yersinia enterocolitica* 0:13 associated with outbreaks in three southern states. *J Food Prot* 1982; 45: 1263.
25. Aluisio CCG, Stanfield JT, Weagant SD, Hill WE. Yersiniosis associated with tofu consumption: serological, biochemical and pathogenicity studies of *Yersinia enterocolitica* isolates. *J Food Prot* 1983; 46: 226-30.
26. Pingulkar K, Kamat A, Bongirwar D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int J Food Sci Nutr* 2001; 52(1): 15-33.
27. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Zaragoza: Ed. Acribia SA; 1996.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 States, United States, 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2006; 55(14): 392-5.
29. Izumi H. Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. *J Food Sci* 1999; 64: 536-9.
30. Adams MR, Hartley AD, Cox LJ. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol* 1989; 6: 69-77.
31. Brasil. Portaria nº 326 de 30 de julho 1997 do Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Aprova regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da União; Poder Executivo*, de 01 de agosto de 1997. Seção 1.
32. Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan AS; 1972.
33. Silva CGM, Andrade SAC, Stamford TLM. Ocorrência de *Cryptosporidium spp* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. *Ciênc Saúde Coletiva* 2005; 10: 63-9.
34. Soares B, Cantos GA. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Rev Bras Ciênc Farm* 2006; 42(3): 455-60.

# Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate

## Fungi contamination in the chamomile, anis and mate teas

RIALA6/1194

Suzana CARVALHO<sup>1</sup>, Rodrigo Makowiecky STUART<sup>1</sup>, Ida Chapaval PIMENTEL<sup>1</sup>, Patricia do Rocio DALZOTO<sup>1</sup>, Juarez GABARDO<sup>2</sup>, Maria Aparecida Cassilha ZAWADNEAK<sup>1</sup>

Endereço para correspondência: Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, Brasil, Caixa Postal 19031, CEP 81531-990, e-mail:mazawa@ufpr.br

<sup>1</sup> Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Recebido: 07.05.2008 – Aceito para publicação: 07.01.2009

### RESUMO

A avaliação da qualidade microbiológica de produtos armazenados, utilizados como plantas medicinais, é fundamental para garantir a segurança alimentar, em função do potencial micotoxigênico apresentado por algumas espécies de fungos. No presente trabalho foram realizados o isolamento, a quantificação e a identificação de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em amostras de chás de camomila (*Chamomilla recutita* L.), erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) e erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.), adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, PR, Brasil. As amostras foram analisadas nas formas de infusão fria, de infusão tradicional e de cocção. Não houve diferenças significativas nos valores de UFC/g nas amostras de camomila, erva-mate e erva-doce analisadas na forma de infusão. Foram observadas diferenças significativas em amostras de camomila e erva-doce em forma de infusão fria em relação às demais formas de processamento de amostras, contudo essas não foram evidentes nas amostras de erva-mate. Os principais gêneros de fungos isolados das amostras analisadas foram *Aspergillus* sp (35,9%); *Penicillium* sp (9,4%); *Fusarium* sp (0,21%); *Rhizopus* sp (11,5%), *Ulocladium* sp (18,4%) e *Mycelia sterilia* (6,84%). Entre os fungos potencialmente toxigênicos, o *Aspergillus* sp foi o mais frequente nos três tipos de chás, seguido de *Penicillium* sp e *Fusarium* sp. Considerando que os fungos com potencial micotoxigênico persistem mesmo após a infusão ou cocção, recomenda-se que estratégias sejam desenvolvidas para garantir a qualidade e a segurança alimentar dos produtos consumidos pela população.

**Palavras-chave.** *Chamomilla recutita*, *Pimpinella anisum*, *Ilex paraguariensis*, fungos micotoxigênicos.

### ABSTRACT

Microbiological evaluation on stored products such as medicinal plants has been a matter of great concern for Food Safety due to the potentiality in producing mycotoxins by some fungal species. In the present paper, the isolation, quantification and identification of potentially mycotoxigenic fungal genera in the chamomile (*Chamomilla recutita*), anise (*Pimpinella anisum*) and mate tea (*Ilex paraguariensis*) tea-leaf samples are reported. The analyzed tea-leaf samples were purchased from stores located in the city of Curitiba, Paraná, Brazil, and they were evaluated in the forms of cool infusion (pouring cool water on the leaves), regular infusion (pouring hot liquid on the leaves) and leaves boiling process. In chamomile, mate tea and anise tea-leaf samples analyzed in infusion form, no significant differences on CFU/g values were showed. The cool infusion forms of chamomile and anise teas presented some significant differences, but not in mate tea cool infusion. The fungal genera isolated from analyzed samples were *Aspergillus* sp (35.9%); *Penicillium* sp (9.4%); *Fusarium* sp (0.21%); *Rhizopus* sp (11.5%), *Ulocladium* sp (18.4%) and *Mycelia sterilia* (6.84%). The potentially mycotoxigenic fungus *Aspergillus* sp was the most frequent in all of analyzed tea samples, followed by *Penicillium* sp e *Fusarium* sp. Considering that the potentially mycotoxigenic fungi remain in tea samples even after being treated by infusion and boiling processes, some strategies should be implemented to guarantee the food quality and safety.

**Key words.** *Chamomilla recutita*, *Pimpinella anisum*, *Ilex paraguariensis*, mycotoxigenic fungi.

## INTRODUÇÃO

Plantas com propriedades medicinais vêm sendo usadas desde a antiguidade no tratamento de diversas doenças no homem e, ainda hoje, uma grande parcela da população de países em desenvolvimento depende unicamente desta forma de tratamento<sup>1</sup>. Com a recente busca por novos compostos com propriedades terapêuticas e a pressão social para consumo de produtos de origem natural, o consumo de plantas medicinais vem aumentando consideravelmente. As ervas, em geral, ao serem colhidas, passam por processos de secagem, normalmente em estufas a céu aberto, onde recebem toda a influência de fungos filamentosos<sup>2</sup>.

A resolução RDC 12/01 da Anvisa, que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos, não contempla a pesquisa de fungos filamentosos em chás ou em alimentos consumidos após adição de líquido com emprego de calor<sup>3</sup>. Embora todas as plantas apresentem micro-organismos endofíticos, muitas vezes produzindo compostos com ação terapêutica, a contaminação superficial por algumas espécies de fungos é um fator preocupante<sup>4</sup>.

Fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Penicillium*, encontrados em praticamente todos os nichos ambientais, apresentam várias espécies produtoras de metabólitos tóxicos durante seu crescimento e desenvolvimento<sup>4</sup>. A ingestão destas micotoxinas pode causar efeitos agudos ou crônicos no homem e outros animais<sup>5</sup>, especialmente no fígado, rins e cérebro, além do alojamento destas nos músculos esqueléticos<sup>6</sup>. Problemas imunológicos e ação carcinogênica também são descritos<sup>7</sup>. As micotoxinas mais importantes são as aflatoxinas (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*), fusariotoxinas (*Fusarium* spp) e ocratoxinas (*Aspergillus alutaceus*, e algumas espécies de *Penicillium*)<sup>8,9</sup>.

Acredita-se que quase todos os fungos são potencialmente produtores de metabólitos tóxicos e que todos os alimentos são suscetíveis à contaminação<sup>5</sup>.

O presente trabalho teve por objetivo o isolamento, identificação e avaliação do número de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em chás de camomila (*Chamomilla recutita* L. (Compositae)) erva-doce (*Pimpinella anisum* L. (Umbelliferae) e erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil (Aquifoliaceae)), avaliados em diferentes modos de preparo (infusão fria, infusão, cocção).

## MATERIAL E MÉTODOS

### ■ Obtenção de amostras

As plantas medicinais: camomila (*C. recutita* L.), erva-doce (*P. anisum* L.) e erva-mate (*I. paraguariensis* St.-Hill.) foram obtidas de sacarias plásticas de volume variável, expostas (setembro de 2005) em três diferentes estabelecimentos dentro do Mercado Municipal de Curitiba, onde tradicionalmente ocorre a venda de produtos a granel. O critério de escolha dos estabelecimentos levou em consideração a melhor estrutura e as condições higiênico-sanitárias dos locais. Em cada estabelecimento, foram coletadas aleatoriamente três amostras de 500 g de cada espécie vegetal, sendo estas acondicionadas em sacos de polietileno. Em laboratório, as amostras de cada vegetal foram misturadas para obtenção de uma amostra composta, da qual se retirou o equivalente a 1 kg para a realização das análises.

### ■ Preparo das amostras

A avaliação foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro), do Departamento de Patologia Básica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. As amostras de chá foram preparadas pelos métodos: infusão fria, infusão e cocção, de acordo com a metodologia de Furlaneto, Marins e Endo<sup>10</sup>. Amostras de 25 g de cada chá foram homogeneizadas em 225 mL de água destilada esterilizada, com auxílio de bastão de vidro, por 3 minutos, constituindo o método de infusão fria. Para o método de infusão foi adicionada água destilada em ebulição. No método de cocção, os chás permaneceram em ebulição por 1 minuto. Foram realizadas diluições decimais seriadas (1/10, 1/100 e 1/1000).

### ■ Contagem e identificação de fungos filamentosos

Alíquotas de 0,1 mL de cada amostra de chá e seus respectivos métodos de preparo foram semeadas em 30 placas de Petri (9 cm Ø) de meio Ágar-Dextrose-Batata (BDA - Difco) acrescido de tetraciclina (100µg.mL<sup>-1</sup>), pelo método de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C por 7 dias e foi estimado o número de UFC/g<sup>11</sup>. Os isolados fúngicos que apresentaram diferentes morfologias coloniais foram isolados em BDA, incubados a 25 ± 1 °C por 10 dias. Para a identificação dos isolados foram utilizados critérios macro e micromorfológicos<sup>12, 13, 14</sup>.

### ■ Análise estatística

Os valores de UFC/g foram transformados em  $\log(x+2)$ , submetidos à análise de variância seguindo um modelo fatorial (3x3) e as médias comparadas por meio de teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.5 2008<sup>15</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o número de UFC/g nos diferentes chás, observou-se que em camomila ( $2,63 \times 10^4$  UFC/g) os valores não diferem dos observados em erva-mate ( $1,73 \times 10^4$  UFC/g) e em erva-doce ( $1,03 \times 10^4$  UFC/g), no método de infusão. Erva-mate e erva-doce são estatisticamente diferentes, sendo os valores de erva-doce menores ( $p \leq 0,01$ ). No método de infusão os três tipos de chás apresentaram valores com diferenças não significativas, sendo encontrado em camomila  $1,5 \times 10^4$  UFC/g, em erva-mate  $1,73 \times 10^4$  UFC/g e em erva-doce  $0,63 \times 10^4$  UFC/g. No método infusão fria, camomila e erva doce não diferiram significativamente ( $5,6 \times 10^4$  UFC/g e  $2,7 \times 10^4$  UFC/g respectivamente), entretanto, ambos apresentaram diferenças em relação à erva-mate ( $10^4$  UFC/g). Todos os valores observados foram superiores ao limite máximo sugerido pela Organização Mundial da Saúde para fitoterápicos<sup>11</sup>, que é de  $10^4$  UFC/g (Tabela 1).

Em relação aos métodos de preparo, o método de infusão é estatisticamente comparável à cocção, diferindo

do método infusão fria, em camomila, o qual apresenta maior número de UFC/g. em camomila, o método infuso apresentou diferença significativa em relação ao método infusão fria. Em erva-mate, os três métodos de preparo são similares e em erva-doce, os métodos infusão e cocção não apresentaram diferença significativa no número de UFC/g, sendo ambos diferentes do método de cocção (Tabela 1).

Observou-se uma tendência de diminuição no número de UFC/g quando os chás foram submetidos ao aquecimento para camomila e erva-doce, sendo este tratamento recomendado como uma das formas de controle de fungos nestas ervas. Entretanto, apesar da redução no número de isolados, os fungos filamentosos, por apresentarem estruturas de resistência, podem permanecer no produto até que existam condições ambientais para o seu desenvolvimento<sup>16</sup>.

Entretanto, em erva-mate os valores observados nos três métodos não foram estatisticamente significativos. Seria desejável uma redução nos níveis de contaminação nos infusos, já que em virtude das tradições regionais, a erva-mate é preparada com água fria e em infusão com água quente, constituindo bebidas típicas popularmente conhecidas como tererê e chimarrão<sup>16</sup>.

As condições de armazenamento e o tempo, bem como os tipos de embalagens podem propiciar o desenvolvimento de micro-organismos nos chás. Os

**Tabela 1.** Média das contagens formadoras de colônia (UFC/g) de fungos isolados de chás de camomila, erva-mate e erva-doce, nos métodos de preparo infusão fria, infusão e cocção

Espécies vegetais	Método de preparo	Contagem (UFCx10 <sup>4</sup> /g*)	Médias**
<b>Camomila</b> ( <i>Chamomilla recutita</i> L. (Compositae))	Infusão fria	5,6000	0.6122 <sup>aA</sup>
	Infusão	2,6300	0.4535 <sup>abB</sup>
	Cocção	1,5000	0.4207 <sup>aB</sup>
<b>Erva-mate</b> ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil (Aquifoliaceae))	Infusão fria	1,0000	0.4771 <sup>bA</sup>
	Infusão	1,7300	0.4855 <sup>aA</sup>
	Cocção	1,7300	0.5166 <sup>aA</sup>
<b>Erva-doce</b> ( <i>Pimpinella anisum</i> L. (Umbelliferae))	Infusão fria	2,7000	0.6239 <sup>aA</sup>
	Infusão	1,0300	0.3839 <sup>bB</sup>
	Cocção	0,6300	0.4597 <sup>aB</sup>

\*Médias de 30 repetições. \*\*Médias transformadas para  $\log(x+2)$ . DMS = 0.1016 CV=33,92%.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

chás de camomila e erva-doce analisados são produtos importados, ficando armazenados durante a entressafra e comercialização, propiciando condições favoráveis ao crescimento de fungos. A erva-mate, por sua vez, fica armazenada por períodos de tempo menores, pois após a colheita é processada, comercializada e consumida em curto espaço de tempo, o que possivelmente leva à diminuição no número de fungos contaminantes.

Os valores encontrados no presente trabalho foram superiores aos obtidos por ROCHA et al.<sup>17</sup>. Estes autores analisaram folhas inteiras de sene (*Cassia acutifolia*) e boldo-do-chile (*Peumus boldus*) vendidas em farmácias de manipulação em Campinas, São Paulo e concluíram que apresentavam um nível de contaminação por fungos de até  $7,37 \times 10^3$  UFC/g e  $1,9 \times 10^3$  UFC/g, respectivamente. Entretanto, os valores obtidos foram inferiores aos obtidos por Araújo e Ohara<sup>18</sup>, que analisaram 45 amostras de drogas vegetais vendidas em feira livre, no Estado de São Paulo e que revelaram níveis de contaminação por bolores e leveduras de até  $10^6$  UFC/g. Também foram inferiores aos resultados encontrados por Martins et al.<sup>19</sup>, que encontraram fungos em 93,5% das amostras de plantas medicinais comercializadas em mercados públicos em Lisboa, Portugal, com níveis médios de  $10^5$  UFC/g.

Os principais gêneros fúngicos isolados no presente trabalho, das amostras de camomila, erva-mate e erva-doce foram *Aspergillus* sp (35,9%); *Penicillium* sp (9,4%); *Fusarium* sp (0,21%); *Rhizopus* sp (11,5%), *Ulocladium* sp (18,4%) e *Mycelia sterilia* (6,84%). Dentre estes, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp são descritos como potencialmente micotoxigênicos. Segundo Furlaneto et al.<sup>10</sup>, estes fungos são produtores de metabólitos secundários, podendo causar diversas patologias prejudiciais ao homem. Resultados semelhantes

aos obtidos no presente trabalho, com relação aos gêneros fúngicos, foram encontrados em erva-mate (*I. paraguariensis*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), sene (*Cassia acutifolia*) e boldo-do-chile (*Peumus boldus*) (Bernardi<sup>18</sup>; Aquino<sup>2</sup>; Rocha<sup>17</sup>), com grande concentração de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp, entre outros. Bugno et al.<sup>4</sup>, compararam 64 diferentes espécies de plantas medicinais comercializadas em São Paulo e avaliaram o número de isolados fúngicos, destes, 9% correspondiam a *Aspergillus* e *Penicillium*.

Em relação à avaliação qualitativa, não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto ao número de *Aspergillus* sp nas ervas analisadas, o mesmo sendo observado para *Fusarium* sp. Em relação ao gênero *Penicillium* sp, em camomila, a sua frequência foi estatisticamente diferente dos demais ( $p \leq 0,01$ ) (Tabela 2).

Em relação à frequência dos gêneros potencialmente micotoxigênicos *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp, em camomila, foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ). Já em erva-mate e em erva-doce, o gênero *Aspergillus* sp diferiu significativamente de *Fusarium* sp e *Penicillium* sp, os quais não diferiram entre si ( $p \leq 0,01$ ) (Tabela 2).

Os gêneros *Ulocladium* sp, *Rhizopus* sp e *Mycelia sterilia* também foram observados no presente trabalho. Segundo Borges<sup>5</sup>, embora não se conheçam evidências de toxicidade para estes gêneros, não se descarta a possibilidade de que seus metabólitos apresentem algum tipo de reação toxigênica no organismo humano ou animal.

Os dados obtidos sugerem que condições inadequadas de qualidade da matéria prima, processamento, distribuição, armazenamento e comercialização dos chás avaliados contribuíram para a contaminação dos

**Tabela 2.** Média de gêneros de fungos potencialmente toxigênicos isolados de chás de camomila, erva-mate e erva-doce

Chás	FUNGOS		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
Camomila	0.5103 <sup>aA</sup>	0.5137 <sup>aA</sup>	0.5059 <sup>aA</sup>
Erva-mate	0.4341 <sup>bA</sup>	0.3304 <sup>bB</sup>	0.3128 <sup>bB</sup>
Erva doce	0.3069 <sup>cA</sup>	0.3010 <sup>bA</sup>	0.3010 <sup>bA</sup>

Médias de 30 repetições. Dados transformados para log (x+2). DMS=0.0525. CV=22,12%.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



produtos por fungos. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos, envolvendo o levantamento quantitativo e qualitativo dos isolados fúngicos. A identificação de fungos contaminantes de chás é uma importante ferramenta para a segurança alimentar dos consumidores destes produtos, uma vez que a presença de micro-organismos produtores de micotoxinas pode acarretar efeitos prejudiciais à saúde do consumidor, dependendo da forma de preparação ao qual são submetidos. Tendo em vista que, mesmo com a infusão ou cocção do produto, os fungos com potencial micotoxigênico ainda persistem, estratégias para garantir a qualidade e a segurança alimentar devem ser desenvolvidas.

## REFERÊNCIAS

1. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(2): 179-89.
2. Aquino S, Gonzalez E, Rossi MH, Dártora MMPA, Silva PV, Corrêa B, Villavicencio ALC. Efeitos da radiação gama na contaminação fúngica de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*). *Reunião Anual do Instituto Biológico* 2005; 72(2); 71.
3. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 jan. 2001. Estabelece padrões microbiológicos sanitários para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 10 jan. 2001. p. 45.4.
4. Bugno A, Buzzo AA, Nakamura CT, Pereira TC, Matos D, Pinto TJA. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41 (4): 491-7.
5. Borges LR, Pimentel IC, Beux MR, Talamini A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hill) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. *Bol CPPA* 2002;20(1): 103-10.
6. Camargo R. *Tecnologia dos Produtos Agropecuários*. São Paulo: Nobel, 1984. 298p.
7. Hsieh DPH, Atkinson DN. Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Adv Exp Med Biol* 1991; 283: 525-32.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução nº. 274 de 15 de out. 2002: Regulamento técnico Mercosul, sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. Brasília (DF); *Diário Oficial União*; 16 out. 2002.
9. Food and Agriculture Organization of United Nations [FAO]. Micotoxinas em grãos. [online]. Folheto técnico nº. 3. [cited 2008 05 mai]; Available from <http://www.fao.org/WAIRDOCS/X5012O/X5012O00.HTM>.
10. Furlaneto L, Marins VD, Endo R. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus infusos. *Saúde em Revista*, 2003; 5(10): 49-52.
11. World Health Organization (WHO). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, 1998, 115 p.
12. Barnett HC, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3a. ed. Minneapolis: Burgess publications, 1986. 241p.
13. Kern ME, Blevins KS. *Micologia médica*. 2ª. edição, São Paulo: Premier; 1999. 256p.
14. Hoog GS, Guarro J. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat roviria i Virgili, ed. 2004. 1126p.
15. Silva FAS. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: *International Conference on Computers in Agriculture*. American Society of Agricultural Engineers 1996; 6: 294-8.
16. Rupollo G, Gutkoski LC, Marini LJ, Elias MC. Sistemas de armazenamento hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. *Cienc Rural* 2004; 34(6):1715-22.
17. Rocha LO, Soares MMSR, Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-chile) comercializados na cidade de Campinas, Brasil. *Rev Bras Cienc Farmac* 2004; 40(4): 521-7.
18. Bernardi E, Caldeira MF, Nascimento JS. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). *Arq Inst Biol*. 2005; 72(4): 489-93.
19. Araújo ALD, Ohara MT. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feira de São Paulo e de infusos derivados. *Rev Bras Cienc Farmac* 2000; 36: 129-37.
20. Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *Int J Food Microb* 2001; 68: 149-51.

## Condições higiênico-sanitárias da pimenta do reino em pó (*Piper nigrum* L.) com o emprego de duas diferentes técnicas para detecção de sujidades leves

Assessment of hygienic conditions of ground pepper (*Piper nigrum* L.) by means of two methodologies for detecting the light filth

RIALA6/1195

Márcia Bittar ATUI<sup>1</sup>\*, Márcia Jorge CASTEJON<sup>2</sup>, Rosemeire YAMASHIRO<sup>2</sup>, Tatiana DE LUCCA<sup>1</sup>, Paul W. FLINN<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: Seção de Microscopia Alimentar, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902, email: marcatui@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup>Seção de Microscopia Alimentar, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Seção de Sorologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório Grain Marketing and Production Research Center, Kansas, USA.

Recebido: 18.03.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

A pimenta do reino deve ser colhida, processada, embalada em condições ideais para evitar a presença de matérias estranhas. Com o objetivo de avaliar as condições higiênicas da pimenta do reino em pó, comercializada em São Paulo, foram analisadas 22 amostras por meio de duas diferentes técnicas no período de maio a setembro de 2006. Para a análise de sujidades leves foi utilizada a técnica de flutuação segundo AOAC e ensaio imunoenzimático – ELISA. Observou-se que 100% das amostras continham fragmentos de insetos e em várias amostras foram demonstrados mais de um tipo de matéria estranha; e 23% das amostras mostraram ser impróprias ao consumo em virtude da presença de pelos de roedor. Para realizar o ELISA, foram adicionados os padrões constituídos de 1, 2, 4, 8 e 10 insetos para estimar o número de insetos nas amostras em análise, por meio de valores de densidade óptica (DO). Verificou-se que 36,4% das amostras apresentaram valores de DO próximos aos correspondentes ao do padrão 8 insetos, 40,9% ao do padrão 4 insetos, 18,2% ao do padrão 10 e 4,5% ao do padrão 2 insetos. A técnica descrita na AOAC mostra ser mais apropriada, em função de sua eficiência de detecção de insetos, bem como de outras matérias estranhas, enquanto que o ELISA detecta especificamente a miosina presente no músculo dos insetos, cuja degradação ocorre com o passar do tempo.

**Palavras-chave.** pimenta do reino, ELISA, flutuação, sujidades leves.

### ABSTRACT

The pepper ought to be collected, processed, packed under optimum conditions to avoid the presence of foreign matters. The hygienic conditions of ground pepper marketed in São Paulo city were assessed by means of two methodologies on 22 samples during the period from May to September 2006. For determining the occurrence of light filth the flotation technique was employed following the methodology recommended by AOAC, and the enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). It was observed that 100% of the samples contained insect's fragments and in various samples more than one type of foreign matters were found. Twenty-three percent of samples were unqualified for consumption owing to the occurrence of rodent hair. For performing ELISA, the standard samples containing 1, 2, 4, 8 and 10 insects were included in order to estimate the number of insects in the analyzed samples by means of optical densities (OD) values. Of 22 samples, 36.4% of samples presented OD values close to that corresponding to standard 8 insects, 40.9% samples to standard 4 insects, 18.2% to 10, and 4.5% to standard 2 insects. According to the results observed in the present study, the technique described in the AOAC is more suitable for detecting not only the insects but also the additional filth in analyzed samples, while ELISA is specific to detect myosin from the insect muscle, which undergoes degradation after some time.

**Key words.** pepper, ELISA, flotation technique, light filth.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de pimenta do reino e sua utilização como guarnição representa um risco à saúde, uma vez que a mesma pode ser utilizada diretamente sobre o alimento, sem nenhuma etapa que neutralize os contaminantes presentes<sup>1</sup>.

A pimenta do reino de boa qualidade deve ser colhida, processada, embalada, transportada e conservada em condições que não desenvolvam e/ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor<sup>2</sup>.

As variações climáticas e a secagem artesanal em regiões tropicais e subtropicais fazem com que as especiarias fiquem mais sujeitas à contaminação por micro-organismos e insetos. Esses últimos, por sua vez, favorecem o crescimento de fungos por meio da atividade metabólica que aumenta o teor de umidade e temperatura do meio<sup>3</sup>.

A pesquisa de matérias estranhas em alimentos é de fundamental importância para a manutenção da qualidade física, sanitária e nutricional do produto. A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) define como matéria estranha qualquer material diferente, não pertencente ao alimento que possa estar presente, devida às práticas inadequadas durante a fase de produção, armazenamento ou distribuição. Dentre as matérias estranhas estão as sujidades leves, como exemplos os insetos e seus fragmentos, ácaros, pelos de animais e bárbulas de aves<sup>4</sup>. A detecção desses contaminantes representa um desafio constante para a indústria e é indicativa das condições sanitárias dos produtos armazenados, estocados e/ou processados.

O Código de Defesa do Consumidor, em vigor desde 1991, provocou mudanças significativas nas relações entre consumidores de alimentos e indústrias processadoras do Brasil. As atuais legislações para o cumprimento dos parâmetros microscópicos são: a Resolução RDC nº 175/MS e a Portaria nº 326/MS, que estabelece disposições gerais para a avaliação de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados e os requisitos gerais de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos ou fabricados para consumo, respectivamente<sup>5,6,7</sup>.

A metodologia de flutuação para a extração de sujidades leves em pimenta do reino é preconizada pela AOAC e vem sendo utilizada há muitos anos nos laboratórios oficiais.

Atualmente, o ensaio imunoenzimático - ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi desenvolvido para detectar insetos em amostras de alimentos, por meio da detecção de miosina, proteína presente no músculo de insetos. A técnica pode apresentar vantagens em relação ao método de flutuação por ser rápida, custo relativamente baixo e permitir a análise de um grande número de amostras em um único ensaio. A miosina presente em grandes quantidades, tanto em larvas como em insetos adultos, é facilmente extraída e difere muito pouco entre as espécies de insetos<sup>8,9</sup>.

Este estudo tem como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias da pimenta do reino em pó, comercializada em diferentes pontos da cidade de São Paulo, por meio das metodologias da AOAC (flutuação) e imunoenzimática - ELISA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 22 amostras de pimenta do reino em pó adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, com marcas, lotes e prazos de validade distintos, no período de maio a setembro de 2006.

O estudo foi realizado nos laboratórios de Microscopia Alimentar e HIV/Aids do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central e no Laboratório *Grain Marketing and Production Research Center*, do Ministério da Agricultura, Kansas, USA.

Para a análise de sujidades leves em pimenta do reino moída foi utilizado o método de flutuação nº 972.40A, descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) International, 18ª ed., 2005 e o ensaio imunoenzimático – ELISA - kit comercial Biotec (Austin TX) para a detecção de miosina, por meio de anticorpos policlonais, observando-se todos os procedimentos sugeridos pelo fabricante<sup>4</sup>.

As amostras foram processadas em duplicatas e os resultados expressos como média aritmética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as amostras de pimenta do reino em pó pelo método de flutuação estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

De acordo com as Tabelas 1 e 2, observou-se, respectivamente, que 100% (22/22) das amostras de pimenta do reino continham fragmentos de insetos e em

**Tabela 1.** Número e porcentagem de amostras com presença de sujidades leves em 22 amostras de pimenta do reino moída. São Paulo, 2008

Pimenta do reino	Presença		Ausência	
	Nº	%	Nº	%
Inseto	4	18,2	18	81,8
Fragmento de inseto	22	100	0	0
Larva	3	13,6	19	86,4
Fragmento de larva	4	18,2	18	81,8
Ácaro	9	41	13	59
Pelo de roedor	5	23	17	77
Fragmento de pena de ave	1	4,5	21	95,5
Pelo de animal não identificado	1	4,5	21	95,5

n = número de amostras.

**Tabela 2.** Amostras de pimenta do reino moída por tipo de matéria estranha encontrada, São Paulo, 2008

Nº da amostra	Fragmento de inseto	Larva	Fragmento de pena de ave	Inseto	Fragmento de larva	Ácaro	Pelo de roedor	Pelo de animal não identificado
1	3,5	1	0	0	0	0	0	0
2	34	0	0	0	0	0	0	0
3	22,5	0	0	0	0	0	0	0
4	7	0	0	1	0	0	0	0
5	11	1	0	1	5	1	0	0
6	6,5	0	0	0	0	0	0	0
7	17	0	0	0	0	0	0	0
8	49,5	0	0	0	0	1	0	0
9	293	1	0	0	1	1	0	1
10	67,5	0	0	0	0	1	0	0
11	40,5	0	0	3	1	2	1	0
13	352	0	0	0	0	0	2	0
14	65	0	0	0	0	0	0	0
15	10,5	0	0	1	0	1	0	0
16	19	0	0	0	0	0	1	0
17	56,5	0	0	0	0	0	2	0
18	12,5	0	0	0	0	1	0	0
19	6	0	0	0	0	1	0	0
20	466	0	1	0	1	9	1	0
21	23	0	0	0	0	0	0	0
22	14	0	0	0	0	0	0	0
23	55	0	0	0	0	0	0	0

várias amostras mais de um tipo de matéria estranha, que podem ter sido originados no campo ou durante o do armazenamento.

Embora estes tipos de insetos não causem nenhum dano à saúde do consumidor, as indústrias devem produzir seus produtos de maneira adequada, adotando as boas práticas de fabricação, armazenamento e distribuição<sup>6,7</sup>.

Os fragmentos de insetos são constituídos por quitina e quando ingeridos pelo homem não são metabolizados, pois o sistema digestivo humano não apresenta a enzima quitinase, deste modo, além de não trazer benefício nutricional podem causar danos à mucosa intestinal<sup>10</sup>.

O produto pode ser infestado e avariado por insetos que se desenvolvem na área de produção e colheita. No campo, os insetos mais comuns são os das Ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera e Hemiptera, e no armazenamento, os que podem atacar o produto são, principalmente, os da Coleoptera e Lepidoptera.

Muitos dos insetos encontrados nas amostras deste estudo pertenciam à ordem Homoptera, que são fitófagos e muitas espécies aparecem como pragas de plantas cultivadas<sup>11,12</sup>.

Neste estudo encontramos 41% (9/22) de amostras com presença de ácaros, que podem veicular bactérias, leveduras e fungos. As partículas fecais dos ácaros possuem substâncias tóxicas capazes de causar sensibilização nos homens ou animais, resultando em enterites agudas e podendo provocar lesões macróticas na mucosa intestinal. Os ácaros encontrados pertenciam às ordens Mesostigmata e Cryptostigmata, sendo muitos da família Oribatidea, que são ácaros de solo<sup>13,14</sup>.

Gecan et al. realizaram um estudo com vários tipos de condimentos adquiridos no varejo para determinação da qualidade sanitária dos mesmos. No que concerne à pimenta do reino, os autores verificaram que das 1523 amostras analisadas, 98,4% continham fragmentos de insetos, 46% estavam contaminadas com ácaros e 20% com pelos de roedores, o que vem de encontro com os dados obtidos<sup>15</sup>.

As amostras com presença de pelos de roedores são impróprias ao consumo por conter matéria estranha considerada prejudicial à saúde, uma vez que os roedores são transmissores em potencial de uma série de doenças, entre elas a leptospirose, salmoneloses, peste (bubônica, pneumônica, septicêmica) e viroses, entre outras<sup>15,16</sup>.

No trabalho realizado por Graciano et al em amostras de pimenta do reino moída, foram encontradas 98,5% de amostras contendo fragmentos de insetos, 24,6% com presença de ácaros e 23,2% com pelos de roedores. Comparando os dados encontrados neste estudo com o realizado em 1999/2000, nota-se que o controle de qualidade realizado pelas indústrias produtoras e empacadoras de pimenta do reino no Estado de São Paulo, não se mostrou efetivo<sup>1</sup>.

Com relação à legislação em vigor, 100% (22/22) das amostras estão em desacordo, por conter insetos e fragmentos, ácaros, pelos de animal não identificado, larvas, fragmentos de larvas, indicando a não adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação<sup>7</sup>. Conforme a RDC nº 175/2003 para matérias estranhas macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde, somente as amostras contendo pelos de roedor (23%) são consideradas impróprias para o consumo<sup>6,11</sup>.

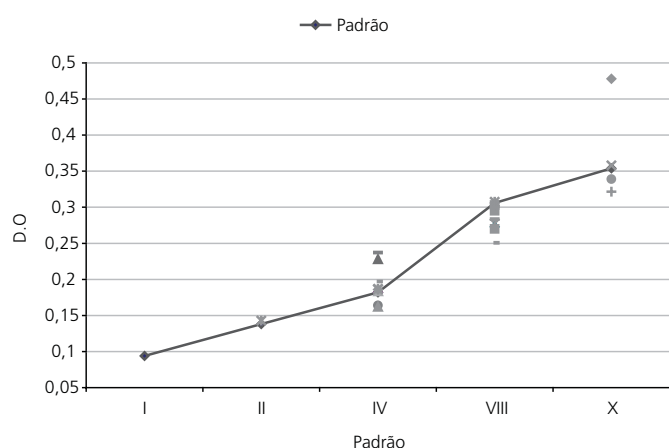
Para a metodologia imunoenzimática – ELISA os resultados são apresentados conforme mostra a Figura 1.

Na Figura 1 foram adicionados os padrões, nos quais o número correspondente indica a quantidade de insetos presentes - 1, 2, 4, 8 e 10 - para estimar o número de insetos presentes nas 22 amostras, por meio das densidades ópticas (D.O) obtidas. De acordo com os padrões acima citados, 36,4% (8/22) das amostras apresentaram suas D.O próximas ao padrão 8, 40,9% (9/22) ao padrão 4, 18,2% (4/22) ao padrão 10 e 4,5% (1/22) ao padrão 2. Pelos padrões pode-se estimar o número de insetos adicionados.

O limite mínimo de detecção do ensaio imunoenzimático - ELISA é de 0,5 inseto e o limite máximo é de 10 insetos por 50 gramas/amostra. A amostra com contaminação acima desse valor terá seu resultado máximo de detecção para 10 insetos, enquanto que pelo método da AOAC não importa a quantidade de infestação que a mesma será detectada, mesmo que em número elevado.

Segundo a literatura, o anticorpo policlonal utilizado no ensaio imunoenzimático - ELISA reage com a miosina presente em várias espécies que podem infestar os grãos, deste modo, a infestação dos grãos e subprodutos pode ser determinada quantitativamente. O ensaio baseado em uma reação colorimétrica fornece resposta consistente para avaliação de uma grande quantidade de insetos<sup>17</sup>.





**Figura 1.** Resultados obtidos (D.O.) das amostras e dos padrões no ensaio imunoenzimático – ELISA.

O kit utilizado neste trabalho foi desenvolvido com anticorpos policlonais e os padrões são específicos para *S.granarius*. Para as amostras infestadas com outros tipos de insetos, os valores de miosina podem estar abaixo daqueles encontrados para o padrão. Nestas amostras de pimenta do reino, não foram identificados todos os insetos presentes e os que foram identificados pertenciam a Ordem Homóptera, sendo assim a quantidade de miosina pode ter sido subestimada, uma vez que o teste foi desenvolvido para insetos pertencentes à Ordem Coleoptera<sup>18</sup>.

No trabalho desenvolvido por Kitto, o ensaio imunoenzimático – ELISA mostrou uma excelente correlação entre a cor produzida e o número de *Sitophilus granarius* adicionados em amostras de trigo limpo. A cor desenvolvida e sua intensidade são proporcionais à quantidade de miosina presente na alíquota avaliada, correlacionando bem com a massa muscular do inseto presente na amostra de trigo ou farinha, o que pode ser extrapolado para o número de insetos presentes na amostra<sup>8</sup>.

No estudo realizado por Atui et al., 2002, foi demonstrado que a miosina presente na farinha de trigo (depois da moagem do grão) degradou após duas semanas. O mesmo pode ter acontecido com a concentração de miosina presente na pimenta do reino adquirida em diferentes pontos do comércio de São Paulo, pois não se sabe quando ocorreu o processamento<sup>18</sup>.

As amostras, quando infestadas com número conhecido de insetos, têm alta correlação com os valores de densidade óptica obtidos no ELISA, conforme verificado em vários estudos. Neste caso, não existe a correlação dos

resultados encontrados pelo método de flutuação com a técnica de ELISA, por não conhecer a contaminação prévia das amostras de pimenta do reino<sup>18-20</sup>.

## CONCLUSÃO

O ensaio imunoenzimático – ELISA utilizado é específico para detectar a miosina presente no músculo dos insetos, portanto somente detecta insetos e fragmentos de insetos, porém sabe-se que a miosina degrada-se com o passar do tempo.

Pelo método de flutuação pode-se determinar qual espécie está infestando a amostra, por meio da identificação dos fragmentos de insetos recuperados, diferente do ensaio imunoenzimático - ELISA que não é capaz de determinar a espécie do inseto presente.

A concentração de miosina pode servir para estimar o número de insetos e fragmentos.

O ensaio imunoenzimático - ELISA é rápido, sensível e barato e de fácil execução, pode ser utilizado no controle de qualidade na indústria, porém não é adequado para as amostras que se encontram no comércio.

O ELISA correlaciona a miosina do inseto presente na amostra fornecendo meios quantitativos para estimar a contaminação por insetos dentro do limite de detecção do kit, já o método de flutuação faz a contagem de fragmentos de insetos sem se preocupar com o tamanho.

Neste trabalho, a metodologia da AOAC foi mais apropriada para pimenta do reino, uma vez que por ela são recuperadas além de insetos e seus fragmentos outras matérias estranhas, tais como ácaros, larvas, pelos de roedores e outros animais.

## AGRADECIMENTOS

Ao funcionário Kenlee Friesen, do *Grain Marketing and Production Research Center*, Manhattan, Kansas, USA, pela ajuda na realização da parte prática deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Graciano RAS, Atui MB, Dimov MN. Avaliação das condições higiênic-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(3): 204-8.
2. Brasil. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e

- Molhos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de setembro 2005. Seção I, p378.
- Correia M, Daros VSMG, Silva RP. Matérias estranhas em canela em pó e páprica em pó, comercializadas no Estado de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(3): 1-10.
  - Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17<sup>o</sup> ed., William Horwitz (Editor), Gaithersburg, MD, AOAC Official Method 972.40A., 2000.
  - Brasil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Presidência da República, Casa Civil. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, nº 176, 12 de setembro de 1990. Suplemento, p.1-12.
  - Brasil. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Materiais Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.htm).
  - Brasil. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamenta as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1 de agosto de 1997. Seção I.
  - Kitto GB. A new rapid biochemical technique for quantitating insect infestation in grain. *Association of operative Millers Bulletin*, 1991; 5835-8.
  - Bair J, Kitto GB. New Methods for rapid determination of insects in grain. *Proceeding of GEAPS*, 1992: pp: 85-94.
  - Gorhan JR. Filth in foods. Implications for health. In: Gorhan JR. ed. *Principles of food analysis for filth, decomposition, and foreign matter*. Washington, DC, Food and Drug Administration. P.27-32 (FDA Technical Bulletin, 1), 1981.
  - Food and Drug Administration (FDA). The food defect action levels: current levels for human use that present no health hazard. Washington, US Department of Health and Human Service/Public Health Service Food and Drug Administration Bureau of Foods, 1982, 20p.
  - Wirtz RA. Food Pests as Disease Agents. In: Gorham JR ed. *Ecology and Management of Food – Industry Pests*. (FDA Technical Bulletin Number 4) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, p:469-75, 1991.
  - Baggio D, Franzolin MR. Análise e controle dos ácaros em alimentos e produtos armazenados. In: *Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*, 1991. 18p.
  - Fletchman CHW. Ácaros em produtos armazenados e na poeira domiciliar. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 1986 (mimeografado).
  - Gecan SJ, Bandler R, Glaze LE, Atkinson JC. Microanalytical quality of ground and unground marjoram, sage and thyme, ground allspice, black pepper and paprika. *Journal of Food Protection* 1986; 49(3): 216-21.
  - Carvalho Neto C. Manual prático de biologia e controle de roedores. 2<sup>a</sup> ed. rev. ampl. São Paulo, CIBA-GEIGY; 1987.
  - Chen WM, Kitto GB. Species-specific immunoassays for *Sitophilus granarius* in wheat. *Food & Agricultural Immunology*. 1993, 5: 165-75.
  - Atui MB. Avaliação de metodologias para detecção de insetos, seus fragmentos e de resíduos de terra diatomácea em grãos e farinha de trigo. [Tese de Doutorado – Pós Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Entomologia – Universidade Federal do Paraná]. 2002. Curitiba, PR, 77 p.
  - Kitto GB, Thomas PN, Lemburg J, Brader B, Burkholder WE. Development of immunoassays for quantitative detection of insects in stored products. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International working Conference on Stored-product Protection*. v. I, 1992, 415-20.
  - Kitto GB, Thomas PN, Lemburg J, Brader B, Burkholder WE. Immunoassays for detecting insect contamination of foods products. In: *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*. RC Bier and LH Stanker (eds). American Chemical Society, Washington, DC. 1996.

## Ação antimicrobiana *in vitro* de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L.

*In vitro* antimicrobial action of extracts glicolics of *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. and *Pimpinella anisum* L.

RIALA6/1196

Cristiane Aparecida PEREIRA<sup>1</sup>, Polyana das Graças Figueiredo VILELA<sup>1</sup>, Luciane Dias de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Antonio Olavo Cardoso JORGE<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Av. Paraíso, 290, Jardim Paraíso, CEP 12235-460, São José dos Campos, SP, Brasil, e-mail: cricabio@gmail.com

<sup>1</sup>Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, São José dos Campos, SP, Brasil.

Recebido: 11.09.2008 – Aceito para publicação: 11.03.2009

### RESUMO

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas, para serem aplicados em produtos farmacêuticos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a propriedade antimicrobiana de extratos glicólicos (75%) de *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* L. (jambolão) e *Pimpinella anisum* L. (erva-doce) sobre cepas padrão de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Bacillus atrophaeus* (esporos). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo, seguindo-se de subcultivos em agar para determinar a concentração microbicida mínima (CMM). Os extratos apresentaram as seguintes CIM e CMM, respectivamente: goiabeira 25% e 50% para *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*; 12,5% e 25% para *S. mutans*, e, 3,12% e 6,25% para *S. aureus*; jambolão 25% e 50% para *C. albicans*, 12,5% e 25% para *E. faecalis* e *S. aureus*, e, 6,25% e 12,5% para *E. coli* e *S. mutans*; erva-doce 12,5% e 25% para *C. albicans* e *S. mutans*, 6,25% e 12,5% para *E. faecalis* e *S. aureus*, e 3,12% e 6,25% para *E. coli*. Conclui-se que, apesar da resistência apresentada por *B. atrophaeus*, os extratos utilizados demonstraram potencial antimicrobiano sobre os demais micro-organismos

**Palavras-chave.** atividade antimicrobiana, *Psidium guajava*, *Syzygium cumini*, *Pimpinella anisum*.

### ABSTRACT

Several researches have been developed to search for new antimicrobial agents from plants, to be used in pharmaceutical products. The aim of this study was to evaluating *in vitro* antimicrobial properties of extracts glicolics (75%) of *Psidium guajava* L. (guava), *Syzygium cumini* L. (jambolan) and *Pimpinella anisum* L. (herb-sweet) on standard strains of *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* and *Bacillus atrophaeus* (spores). During the experiment, the minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by broth dilution method, following by subcultivation in agar in order to determine the minimal microbicide concentration (MMC). The extracts showed the following CIM and MMC, respectively: *Psidium guajava* L 25% and 50% for *C. albicans*, *E. faecalis* and *E. coli*, 12.5% and 25% for *S. mutans*, and 3.12% and 6.25% for *S. aureus*; *Syzygium cumini* L. 25% and 50% for *C. albicans*, 12.5% and 25% for *E. faecalis* and *S. aureus*, and 6.25% and 12.5% for *E. coli* and *S. mutans*; *Pimpinella anisum* L -12.5% and 25% for *C. albicans* and *S. mutans*, 6.25% and 12.5% for *E. faecalis* and *S. aureus*, and 3.12% and 6.25% for *E. coli*. It could be concluded that, despite the resistance by *B. atrophaeus*, the extracts used showed antimicrobial potential on the other microorganisms.

**Key words.** antimicrobial properties, *Psidium guajava*, *Syzygium cumini*, *Pimpinella anisum*.

## INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica tem produzido nos últimos tempos um expressivo número de novos antimicrobianos, no entanto, a resistência microbiana a esses fármacos também aumentou. A habilidade genética dos micro-organismos de adquirir e transmitir resistência aos antimicrobianos utilizados como agentes terapêuticos<sup>1</sup>, torna a perspectiva do uso de antibióticos incerta. Desta forma, torna-se necessário controlar o uso de antibióticos, ampliar pesquisas sobre o mecanismo genético de resistência e desenvolver novos antimicrobianos sintéticos ou naturais<sup>2,3</sup>.

Atualmente, o emprego de plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças corriqueiras tem sido apoiado pela classe médica e por programas oficiais de saúde. O Brasil possui um número muito grande de espécies vegetais nativas que são consideradas medicinais<sup>4,5,6</sup>, mas muitas ainda não tiveram qualquer avaliação científica do seu uso medicinal, o que é essencial para que possam continuar a serem utilizadas com segurança pela população. No âmbito odontológico, as pesquisas com produtos naturais têm aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e mais biocompatíveis, além de apresentarem valores mais acessíveis à população<sup>7</sup>.

Existe na cavidade bucal uma grande variedade de micro-organismos que podem, por um desequilíbrio, tornar-se patogênicos, muitos dos quais estão relacionados com cárie, doenças periodontais, infecções endodônticas e lesões de mucosa. O gênero *Enterococcus*, que compõe um grupo de bactérias Gram-positivas, está associado a infecções endodônticas e lesões periapicais. *Enterococcus faecalis* é frequentemente encontrado em infecções persistentes dos canais radiculares, em que houve insucesso do tratamento endodôntico, exibindo sinais de periodontite crônica apical<sup>8</sup>.

*Staphylococcus aureus* é um micro-organismo patogênico oportunista relevante na cavidade bucal, que tem a capacidade de atuar como microbiota suplementar, sendo frequentemente encontrada em abscessos periapicais e estomatites protéticas<sup>9</sup>.

*Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico do desenvolvimento da cárie, devido a sua habilidade em aderir firmemente à superfície dos dentes pela produção de polissacarídeos extracelulares e sua capacidade de produzir ácidos<sup>10</sup>.

Dentro deste grupo de bactérias Gram-positivas, encontra-se também *Bacillus atropheus* (denominado anteriormente de *Bacillus subtilis*), um micro-organismo que apresenta resistência aos processos de esterilização e desinfecção, servindo como parâmetro para a avaliação da eficiência de agentes antimicrobianos<sup>11</sup>, especialmente na desinfecção de superfície, viabilizando seu uso no ambiente hospitalar ou consultório odontológico.

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, além de possuir diferentes fatores de virulência e gerar produtos e subprodutos tóxicos aos tecidos apicais e periapicais, contém endotoxina em sua parede celular, que exercem uma série de efeitos biológicos relevantes, que conduzem a uma reação inflamatória e à reabsorção dos tecidos mineralizados<sup>12</sup>.

As leveduras do gênero *Candida*, que vivem comumente na cavidade bucal de indivíduos aparentemente saudáveis, é um micro-organismo oportunista, que, na dependência de fatores predisponentes que alteram a integridade orgânica, modifica a sua conformação leveduriforme para uma forma filamentosa, tornando-se patogênico<sup>13</sup>. Aproximadamente metade da população adulta saudável abriga essas espécies na cavidade bucal<sup>14</sup>, sendo *Candida albicans* o micro-organismo comensal evidenciado com maior frequência atingindo até 70% do total de isolamentos, tendo um papel relevante no desencadeamento de infecções bucais<sup>15</sup>.

Diante do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, existe uma grande preocupação relacionada a qual tipo de tratamento utilizar no combate às infecções provocadas por micro-organismos. O emprego de extratos brutos de plantas tem merecido a atenção de pesquisadores de vários países, já que podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos quando comparados aos antimicrobianos<sup>16</sup>.

Dentre as diversas plantas existentes e utilizadas como terapia alternativa pode-se citar *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* L. (jambolão) e *Pimpinella anisum* L. (erva-doce).

A planta *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, apresenta-se na natureza em forma de arbusto perene da família *Mirtaceae*. É uma árvore frutífera, originária das Américas Central e do Sul, cultivada em todos os países de clima tropical. Na medicina popular é utilizada para cólicas, colite, diarreia, disenteria e dor de barriga<sup>17,18</sup>. Vieira et al.<sup>19</sup> avaliaram o efeito microbicida dos extratos de broto de *Psidium guajava* L. sobre *E. coli* e *S. aureus*. De acordo com os



autores, o extrato do broto da goiabeira apresentou atividade antimicrobiana, tornando-se, portanto, uma opção viável devido sua rápida ação curativa, fácil cultivo em países tropicais e seu baixo custo.

*Syzygium cumini* L., conhecida popularmente como jambolão, é uma planta da família *Mirtaceae*, oriunda da Índia oriental<sup>20</sup>, bastante conhecida na medicina popular indiana e paquistanesa por seus efeitos hipoglicemiantes<sup>21</sup>. Vem sendo cultivada no Brasil como planta ornamental e o chá de suas folhas é normalmente utilizado por pacientes diabéticos<sup>22,23,24</sup>. Em estudo realizado por Oliveira et al.<sup>25</sup>, o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de jambolão foi ativo sobre cepas padrão de *C. albicans*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Candida krusei*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella flexneri*.

*Pimpinella anisum* L., conhecida como erva-doce ou anis, é uma planta pertencente a família *Umbelliferae* originária da costa mediterrânea. É usada como antiespasmódica, inibidora da fermentação intestinal e carminativa<sup>26</sup>. Alguns estudos mostraram importantes atividades atribuídas a *Pimpinella anisum* L. Os testes feitos por Boskabady e Ramazani-Assari<sup>27</sup> constataram a ação broncodilatadora do óleo essencial e dos extratos etanólicos e aquosos desta planta. Forte atividade antioxidante e notável ação antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas também foi demonstrado<sup>28</sup>.

Tendo em vista o potencial antimicrobiano de alguns extratos de plantas, o emprego de compostos naturais na odontologia pode ser considerado instrumento importante na terapia de diversas patologias bucais, como na prevenção e tratamento de cárie dentária, doença periodontal, infecções endodônticas e candidose bucal<sup>7</sup>. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana dos extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L. sobre cepas padrão de *Bacillus atrophaeus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste estudo extratos glicólicos de *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), *Psidium guajava* L. (goiabeira) e *Syzygium cumini* L. (jambolão), adquiridos da empresa Multi Vegetal (Campinas, São Paulo, Brasil),

acompanhados de laudo de identificação. No preparo de cada extrato foi utilizada 75% de massa seca obtida através das folhas, *Syzygium cumini* L. e *Psidium guajava* L., e frutos, *Pimpinella anisum* L., diluída em 25% de propileno glicol, resultando numa concentração de 750 mg/mL.

A atividade antimicrobiana dos extratos glicólicos foi avaliada em cepas padrões de *Bacillus atrophaeus* (ATCC 65961), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Streptococcus mutans* (ATCC 35688). As cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

As bactérias foram semeadas em ágar infusão cérebro coração, BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, USA), e incubadas em estufa a 37°C em aerobiose, sendo as cepas de *S. mutans* incubadas em condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>), durante período de 24 horas. Para *B. atrophaeus* foram utilizados os esporos obtidos de acordo com a metodologia proposta por Kuroiwa et al.<sup>29</sup>. As leveduras de *C. albicans* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA), a 37°C, e incubadas por 24 horas. Os cultivos foram suspensos em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ajustados por espectrofotômetro (Micronal B582/Versão 3.0.4, São Paulo, Brasil) até a obtenção de uma suspensão padronizada contendo 10<sup>6</sup> células/mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda (nm) foram, respectivamente: 530 e 0,284 para *C. albicans*; 307 e 0,178 para *B. atrophaeus*; 590 e 0,324 para *E. coli*; 760 e 0,298 para *E. faecalis*; 490 e 0,374 para *S. aureus*; e 398 e 0,620 para *S. mutans*.

Para determinar a CIM dos extratos, foi utilizado o método de microdiluição em caldo<sup>30</sup>. Foram realizadas diluições seriadas dos extratos (50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125%), em placas de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA) com 1mL em cada orifício de caldo infusão cérebro coração, BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, USA) para as bactérias, e 1 mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) para as leveduras. Posteriormente, foi inoculado 100 µL da suspensão padronizada de cada cepa do micro-organismo a ser testado. O grupo controle positivo foi constituído de caldo e o inóculo microbiano avaliado. O grupo controle negativo foi constituído de caldo e extrato. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. Foi considerada como CIM a menor concentração dos extratos glicólicos testados que inibiu



o crescimento visível dos micro-organismos, ou seja, sem turvação do caldo e depósito microbiano.

Paralelamente, também foi realizado teste para avaliar a capacidade antimicrobiana do solvente propilenoglicol.

Após o período de incubação, foram determinadas as concentrações microbicidas mínimas (CMM). Alíquotas de 100 µL dos testes anteriores foram semeadas em placas de Petri contendo para as bactérias ágar BHI, e para as leveduras ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. A CMM foi definida como a menor concentração dos extratos glicólicos testados que não apresentou crescimento microbiano em meio sólido.

Em todos os ensaios com cepas *S. mutans* a incubação foi realizada em estufa com condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C. Todos os testes foram realizados em duplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em decorrência do uso abusivo de antibióticos tradicionais e do crescente aumento da resistência microbiana, os microbiologistas clínicos têm demonstrado grande interesse na investigação de extratos de plantas com potencial antimicrobiano<sup>31</sup>.

A escolha dos micro-organismos desta pesquisa buscou abranger espécies usualmente utilizadas em estudos para avaliação de atividade antimicrobiana, bem como sua associação com diversas patologias que acometem a cavidade bucal. Já a escolha de micro-organismo *B. atrophaeus* em sua forma de esporos foi para servir como parâmetro no estudo da eficácia dos extratos testados, uma vez que esta forma apresenta grande resistência aos antimicrobianos.

O teste de atividade antimicrobiana realizado com o solvente propilenoglicol, isoladamente, não apresentou efeito inibitório ou microbicida sobre os micro-organismos analisados. O controle positivo realizado apresentou excelente viabilidade das cepas utilizadas. O controle negativo não apresentou qualquer tipo de contaminação do caldo ou dos extratos testados.

Os resultados da determinação da CIM e CMM obtidos dos extratos glicólicos testados, de acordo com a metodologia utilizada, estão representados na Tabela 1, onde se pode constatar que os extratos glicólicos de *P. guajava* L., *S. cumini* L. e *P. anisum* L. apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas padrões de *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli* e *C. albicans*, em diferentes concentrações, mas não foram efetivos contra forma esporulada de *B. atrophaeus*.

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos glicólicos de *Pimpinella anisum* L., *Psidium guajava* L. e *Syzygium cumini* frente aos microrganismos *Bacillus atrophaeus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*

Microrganismo	CIM (% a partir da concentração original 750 mg/mL)			CMM (% a partir da concentração original 750 mg/mL)		
	<i>P. anisum</i>	<i>P. guajava</i>	<i>S. cumini</i>	<i>P. anisum</i>	<i>P. guajava</i>	<i>S. cumini</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i> (ATCC 65961)	R*	R*	R*	R*	R*	R*
<i>Candida albicans</i> (ATCC 18804)	12,5	25	25	25	50	50
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	6,25	25	12,5	12,5	50	25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	3,12	25	6,25	6,25	50	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	6,25	3,12	12,5	12,5	6,25	25
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 35688)	12,5	12,5	6,25	25	25	12,5

\*R= Resistente.

Para avaliar se as CIM apresentaram efeito microbiostático ou microbicida realizaram-se ensaios para determinar CMM. Como pode-se observar, as CIM dos extratos testados apresentaram somente efeito inibitório ao crescimento dos micro-organismos, uma vez que para obter o efeito microbicida foram necessárias concentrações maiores dos extratos (CMM) (Tabela 1).

Dentre os extratos utilizados, o extrato glicólico de *Pimpinella anisum* L. foi o mais efetivo frente aos micro-organismos, posto que baixas concentrações do mesmo apresentaram ação antimicrobiana. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato glicólico das folhas de *P. guajava* L. foi de 25% frente a *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*; 12,5% para *S. mutans* e 3,12% para *S. aureus*, enquanto a concentração microbicida mínima (CMM) foi de 50% para *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*; 25% para *S. mutans* e 6,25% para *S. aureus*. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Holetz et al.<sup>32</sup>, que encontraram atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. guajava* L. sobre *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, indicando que as folhas desta planta poderiam ser utilizadas pelo seu efeito antimicrobiano. Sanches et al.<sup>33</sup> também demonstraram efeito inibitório dos extratos hidroalcoólico e aquoso da folha, raiz e casca do caule de *P. guajava* L. sobre cepas padrão de *S. aureus*. Mas os extratos utilizados por esses autores não foram ativos contra *E. coli*, divergindo dos resultados obtidos no presente estudo, onde o extrato glicólico das folhas de *P. guajava* L. teve efeito microbiostático e microbicida frente a este micro-organismo.

O extrato glicólico das folhas de *P. guajava* L. utilizado apresentou as menores CIM e CMM, 3,125% e 6,25% respectivamente, sobre o crescimento de *S. aureus*, o que pode ser considerado um achado significativo, pois este micro-organismo é frequentemente resistente aos antibióticos rotineiramente utilizados<sup>19</sup>. Dados semelhantes também foram demonstrados por Gnam e Demello<sup>34</sup> e Jaiarj et al.<sup>35</sup> que ao avaliarem o efeito dos extratos aquoso e alcoólico das folhas de *P. guajava* L., relataram resultados nos quais estes extratos exerceram forte poder inibitório ao crescimento de *S. aureus*.

O extrato glicólico das folhas de *S. cumini* L. apresentou as seguintes CIM e CMM, respectivamente: 25% e 50% para *C. albicans*; 12,5% e 25% para *E. faecalis* e *S. aureus*, e, 6,25% e 12,5% para *E. coli* e *S. mutans*. Michelin et al.<sup>36</sup> (2005) também demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato seco das folhas de *S. cumini* L. sobre cepas padrão e resistentes de *E. coli*, e sobre cepas

padrão de *S. aureus*, mas o extrato não foi capaz de inibir o crescimento de cepas padrão de *C. albicans*, o que diverge neste último caso, dos dados encontrados na presente pesquisa, pois o extrato de *S. cumini* L. foi efetivo contra *C. albicans*. Nascimento et al.<sup>3</sup>, em pesquisa realizada para avaliar a ação antimicrobiana de diversos extratos hidroalcoólicos de vegetais a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, verificaram que o extrato de *S. cumini* inibiu 57,1% dos micro-organismos testados, dentre os quais estavam cepas resistentes e sensíveis de *S. aureus*, e, cepas resistentes de *C. albicans* e *E. coli*. Além disso, esses autores também avaliaram algumas associações de antibióticos e extratos vegetais ou fitofármacos, e concluíram que o efeito sinérgico possibilita que os antibióticos já ineficazes possam ter ação sobre micro-organismos resistentes.

Em relação a *P. anisum* L., o conhecimento sobre o seu potencial antimicrobiano tem despertado o interesse científico, levando ao desenvolvimento de estudos que constataram atividade antimicrobiana, antifúngica e antimalárica de alguns dos compostos desta planta<sup>37</sup>. O extrato glicólico dos frutos de *P. anisum* L. apresentou as seguintes CIM e CMM, respectivamente: 12,5% e 25% para *C. albicans* e *S. mutans*; 6,25% e 12,5% para *E. faecalis* e *S. aureus*, e, 3,125% e 6,25% para *E. coli*. Em 2003, Gulçin et al.<sup>28</sup> verificaram que os extratos aquoso e etanólico de *P. anisum* L., na concentração de 25%, foram efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, resultado semelhante ao do presente estudo (CIM de 6,25% e CMM de 12,5%). Porém, esses autores não obtiveram inibição do crescimento de cepas padrão de *E. coli* e *C. albicans*, o que difere dos resultados do atual estudo, onde esta planta teve ação inibitória no crescimento de tais micro-organismos. Kosalec et al.<sup>38</sup> relataram a atividade antifúngica do extrato fluido e do óleo essencial de *Pimpinella anisum* L. contra leveduras do gênero *Candida* e dermatófitos, sendo que a espécie *C. albicans* apresentou larga zona de inibição na utilização de ambos os produtos naturais. Ainda nesse trabalho, a atividade antifúngica dos dois produtos naturais foi maior ou semelhante à atividade antifúngica de cetoconazol.

*Bacillus atropheus* mostrou-se resistente a todas as concentrações dos extratos glicólicos das plantas utilizadas nesta pesquisa, o que diverge dos trabalhos realizados por Holetz et al.<sup>32</sup> e Sanches et al.<sup>33</sup>, nos quais os extratos hidroalcoólico e aquoso de *P. guajava* L. inibiram o crescimento de *B. atropheus*, mas por outro lado, corrobora com o trabalho de Nascimento et al.<sup>3</sup>, que não

conseguiram inibição de crescimento de *B. atrophaeus* com o extrato de *S. cumini* L.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com o histórico das espécies vegetais estudadas, quanto a sua propriedade antimicrobiana e à demonstração de que os micro-organismos, com exceção do *B atrophaeus*, mostraram-se sensíveis aos extratos glicólicos utilizados. É importante ressaltar que até a finalização desta pesquisa não foram encontrados estudos que fizessem uso do extrato glicólico destas plantas e que a análise da atividade antimicrobiana nos diversos trabalhos foi realizada por diferentes metodologias, o que torna difícil uma análise comparativa fidedigna.

A demonstração da propriedade antimicrobiana dos extratos utilizados frente às cepas padrões foi relevante porque as cepas testadas são de micro-organismos que estão associados com patologias que acometem a cavidade bucal e geralmente são utilizadas em pesquisas para análise de atividade antimicrobiana. No entanto, como estes resultados se aplicam somente a estas cepas padrões, posteriores estudos devem abordar cepas resistentes e assim ampliar a pesquisa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos necessários para combater micro-organismos resistentes.

## CONCLUSÃO

Apesar da resistência apresentada pela bactéria *B. atrophaeus*, os resultados obtidos neste estudo demonstraram o potencial antimicrobiano dos extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella* frente as demais cepas padrões de *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli* e *C. albicans*, micro-organismos que estão relacionados às patologias da cavidade bucal. Porém, são requeridos novos estudos com estas espécies vegetais para se determinar quais as substâncias presentes nos extratos e que contribuem para a atividade biológica, como também para entender os mecanismos de ação e avaliar a citotoxicidade, visando assim uma possível aplicação farmacêutica.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão das bolsas de mestrado.

## REFERÊNCIAS

01. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. *Science* 1992; 257(5073):1050-5.
02. Amoroso MCM. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Bot Bras* 2002; 16: 189-203.
03. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31(4):247-56.
04. Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Rev Bras Farmacogn* 2005; 15: 392-413.
05. Lima MRF, Ximenes CPA, Luna JS, Sant'Ana AEG. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16(3): 300-6.
06. Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16(3): 408-20.
07. Castilho AR, Murata RM, Pardi V. Produtos naturais em odontologia. *Rev Saúde* 2007; 1(1):11-9.
08. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev de Odontol UNESP* 2007; 36(2):163-8.
09. Martins CAP, Koga-Ito CY, Jorge C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral. *Braz J Microbiol* 2002; 33(3): 236-40.
10. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Graner RO et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol* 2004; 53(7): 697-703.
11. Faraco-Junior IM, Piva F, Fonseca ACE. Avaliação da atividade antimicrobiana do formocresol e do paramonoclorofenol canforado. *Robrac* 2006; 15: 16-22.
12. Oliveira LA, Barbosa SV. Reação pulpar ao lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. *Rev ABO* 2006; 14(2): 95-8.
13. Ramos INC, Vasconcelos LCS, Lima MGGC, Figueiredo RLQ. Candidose Bucal em pacientes HIV-positivos. *JBC J Bras Clin Estet Odontol* 1999 3(13): 59-61.
14. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980; (25): 1-10.
15. Jorge AOC, Koga Ito GY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. *Rev Fac Odontol Univ São Paulo* 1997; 11(4): 279-85.
16. Anibal PC. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de odontologia de Piracicaba, 2007. 71p.
17. Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn* 2005; 15(4): 361-72.
18. Tôrres AR, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Araújo EC. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Rev Bras Farmacogn* 2005;15(4): 373-80.

19. Vieira RHSE, Rodrigues DP, Gonçalves FA, Menezes FGR, Aragão JS, Sousa OV. Microbicidal effect of medicinal plants extracts (*Psidium guajava* LINN. and *Carica papaya* LINN.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43(3):145-8.
20. Morton J. Jambolan. In: Morton J. Fruits of warm climates. Miami: Creative Resource Systems; 1987. p.375-8.
21. Prince PSM, Menon VP, Pari L. Hypoglycemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 1998; 61(1):1-7.
22. Silva-Neto CR, Lopes RA, Contrera MGD, Pozetti GL. Efeitos antagônicos de plantas medicinais na diurese de ratos. *Pesqui Homeopática* 1987; 4(1): 17-21.
23. Teixeira CC, Fuchs FD, Blotta RM, Knijnik J, Delgado IC, Netto MS et al. Effect of tea prepared from leaves of *Syzygium jambos* on glucose tolerance in non-diabetes subjects. *Diabetes Care* 1990; 13(8):907-8.
24. Soares JCM, Costa ST, Cecim M. Níveis glicêmicos de colesterol em ratos com *Diabetes Mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. *Ciênc Rural* 2000; 30(1):113-8.
25. Oliveira GF, Furtado NAJC, Silva-Filho AA, Martins CHG, Bastos JK, Cunha WR et al. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. *Braz J Microbiol* 2007; 38(2): 381-4.
26. Bruneton J. Elementos de fitoquímica e farmacognosia. Zaragoza: Acriba, 1991. 594p.
27. Boskabady MH, Ramazani-Assari M. Relaxant effect of *Pimpinella anisum* on isolated guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *J Ethnopharmacol* 2001; 74: 83-8.
28. Gulçin I, Oktay M, Kufrevioglu OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 2003; 83(3):371-82.
29. Kuroiwa K, Nakayama H, Kuwahara T, Tamagawa K, Hattori K, Murakami K, et al. Augmenting effect of acetic acid for acidification on bactericidal activity of hypochlorite solution. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36: 46-9.
30. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64: 711-3.
31. Volpato AMM. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico [Tese de doutorado]. Curitiba:Universidade Federal do Paraná, 2005. 111p.
32. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias BPF. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(7):1027-31.
33. Sanches NR, Cortez DAG, Schiavini MS, Nakamura CV, Dias BPF. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Braz Arch Biol Technol* 2005; 48(3):429-436.
34. Gnan SO e Demello MTJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. *J Ethnopharmacol* 1999; 68(1-3):103-8.
35. Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, Peungvicha P, Suriyawong P, Saraya S, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:203-22.
36. Michelin DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev Bras Farmacogn* 2005; 15:316-20.
37. Tabanca N, Bedir E, Ferreira D, Slade D, Wedge DE, Jacob MR, et al. Bioactive constituents from Turkish *Pimpinella* species. *Chem Biodivers* 2005; 2(2):221-32.
38. Kosalec I, Pepelinjak S, Kustrak D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm* 2005; 55:377-85.

# Estrutura da comunidade fitoplanctônica com ênfase em Cyanobacteria no reservatório de Tapacurá-PE

## Structure of the phytoplankton community with emphasis on Cyanobacteria in Tapacurá reservoir- PE

RIALA6/1197

Carolina Mendes de ANDRADE<sup>1</sup>, Cícero Tiago da Silva GOMES<sup>1</sup>, Nísia Karine Cavalcanti Vasconcelos ARAGÃO<sup>1</sup>, Edvani Maria SILVA<sup>1</sup>, Giulliani Alan da Silva Tavares de LIRA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Rua Fernandes Vieira, s/n, Boa Vista, CEP 50050-210, Recife, PE, Brasil, e-mail: carol\_mendes\_andrade@hotmail.com

<sup>1</sup>Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE).

Recebido: 07.11.2008 – Aceito para publicação: 24.12.2008

### RESUMO

O reservatório de Tapacurá, localizado a 30 km da cidade do Recife, caracteriza-se como um importante manancial de abastecimento do município e de parte de sua região metropolitana. Com o objetivo de caracterizar qualitativamente e quantitativamente a comunidade fitoplanctônica deste ecossistema, foram realizadas 12 amostragens, no período de junho/2006 a janeiro/2007, em uma única estação, próxima ao ponto de captação de água. A frequência de ocorrência, abundância, dominância, índice de diversidade específica e equitabilidade dos táxons foram determinados como parte complementar do estudo. Foram identificados 22 táxons com predominância dos grupos: Cyanobacteria (45,0%), Chlorophyta (36,0%) Chrysophyta (9,0%) Euglenophyta (5,0%) e Cryptophyta (5,0%). As Cyanobacteria apresentaram as maiores densidades, contribuindo em média com 95,0% dos organismos quantificados. Quanto à frequência de ocorrência, 32,0% dos táxons foram considerados muito frequentes, 32,0% frequentes, 27,0% pouco frequentes e 9,0% raros. Dos táxons identificados nove destacaram-se como abundantes em pelo menos uma das amostragens. *Raphidiopsis mediterranea* e *Microcystis aeruginosa* foram as únicas espécies que apresentaram dominância durante o período estudado. As maiores densidades observadas para espécies de Cyanobacteria configuram-se como potenciais riscos à saúde pública, uma vez que alguns destes táxons apresentam histórico de produção de toxinas.

**Palavras-chave.** reservatório, comunidade fitoplanctônica, Cyanobacteria.

### ABSTRACT

The Tapacurá reservoir is located at 30 km from the city of Recife, PE – Brazil, and it is an important water supply system for the municipality and surrounding region. The present study characterized the quality and the quantity of the phytoplankton community in this ecosystem. Twelve sample collections were carried out from June 2006 to January 2007 at a single sampling site next to the point of water intake. The frequency in occurrence, abundance, dominance, species diversity index, and equitableness index were determined as a complementary part of the study. Twenty-two taxa were identified, with the predominance of following groups Cyanobacteria (45.0%), Chlorophyta (36.0%) Chrysophyta (9.0%) Euglenophyta (5.0%) and Cryptophyta (5.0%). Cyanobacteria exhibited the highest density, accounting for 95.0% of the quantified organisms. Regarding to the frequency in occurrence, 32.0% of taxa were considered highly frequent; 32.0% were regarded frequent; 27.0% were infrequent; and 9.0% were considered rare. Among the identified taxa, nine stood out as being abundant at least in one of the sampling sessions. *Raphidiopsis mediterranea* and *Microcystis aeruginosa* were the only species that exhibited dominance throughout the study period. The highest densities of Cyanobacteria are configured as potential risk to public health, as some of these taxa have a history of toxin production.

**Key words.** reservoir, phytoplankton community, Cyanobacteria.



## INTRODUÇÃO

Problemas relacionados à eutrofização artificial, causada pela ação antrópica, são comuns e têm gerado inúmeras alterações na estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica, que respondem prontamente às alterações nos ecossistemas aquáticos. A composição da comunidade fitoplanctônica e o seu comportamento no ambiente refletem melhor do que qualquer artefato tecnológico, o valor das alterações nos corpos d'água<sup>1</sup>.

Dentre os organismos fitoplanctônicos, as Cyanobacteria apresentam estratégias de crescimento que sob condições ambientais favoráveis, como temperatura em torno de 25 °C, valores de pH entre 6 a 9, concentração elevada de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e estabilidade da coluna d'água, podem promover as chamadas florações<sup>2</sup>, capazes de liberar para o meio metabólitos secundários tóxicos conhecidos como cianotoxinas<sup>3,4</sup>.

Em corpos d'água utilizados para abastecimento humano, as florações são definidas em termos do número de células que passam a ser impróprio e/ou perigoso para populações humanas<sup>5</sup>, sendo estes a partir de  $10 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup> ou  $20 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1(6)</sup>. Este fenômeno, que não é exclusivo das Cyanobacteria, mesmo em alguns casos não sendo considerado um risco para a saúde pública, pode provocar uma série de transtornos, como: o entupimento dos filtros nas estações de tratamento, produção de compostos que geram sabor e odor desagradáveis à água, alteração dos aspectos cênicos do ambiente, déficit de oxigênio, entre outras perturbações.

No Brasil, um exemplo clássico e grave dos problemas relacionados a proliferação desses organismos ocorreu no município de Caruaru-PE, em 1996, onde na ocasião dezenas de pacientes de uma clínica de hemodiálise morreram, após o contato com água contaminada por cianotoxinas<sup>7</sup>. Em Itaparica-BA, em 1988, a intoxicação de 200 pessoas, dentre as quais 88 faleceram, após a ingestão de água do reservatório, também demonstraram fortes indícios de contaminação por cianotoxinas, no entanto não houve confirmação<sup>8</sup>.

O reservatório de Tapacurá é um importante sistema de abastecimento do Grande Recife, no qual a presença de saxitoxinas e anatoxina-a, durante florações provocadas por *Anabaena spiroides* Klebahn, *Pseudanabaena* sp, *C. raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing, foram detectadas em amostras coletadas de março a maio de 2002<sup>9</sup>.

Nesse sentido, considerando a obrigatoriedade do monitoramento das Cyanobacteria nas captações de água

dos mananciais de abastecimento, disposta na portaria nº 518, do Ministério da Saúde<sup>6</sup>, de 25 de março de 2004, o presente trabalho tem como objetivo, apresentar uma avaliação da estrutura da comunidade fitoplanctônica do reservatório de Tapacurá-PE, fornecendo informações sobre a dinâmica das Cyanobacteria, e indicando um diagnóstico do ambiente quanto a presença de espécies com histórico na produção de toxinas. Desta forma, a presente pesquisa configura-se como um alerta sobre o potencial risco à saúde pública, uma vez que constantemente ocorrem florações de Cyanobacteria nesse ecossistema.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ■ Área de estudo

O reservatório de Tapacurá (latitude 08°02'14"S e longitude 35°09'46"W) localiza-se a 30km da cidade de Recife-PE, no município de São Lourenço da Mata (Figura 1). Apresenta capacidade de acumulação de água de 94.200.000m<sup>3</sup>, constituindo-se no mais importante manancial de abastecimento do grande Recife, contribuindo com mais de 25% da água consumida. Faz parte da bacia do Rio Capibaribe, limitando-se ao norte com os Rios Goitá e Cotunguba, a oeste com o Rio Cotunguba, ao sul com os Rios Ipojuca, Pirapama e Jaboatão e a leste com os Rios Jaboatão e Muribara<sup>10</sup>.

Durante o período estudado a região foi caracterizada climatologicamente quanto à precipitação, que variou de 36 mm no mês de outubro/06 a 151 mm no mês de julho/06 (*The Weather Channel*<sup>11</sup>).

### ■ Procedimento de coleta

As coletas foram realizadas de julho/06 a janeiro/07 contemplando 12 amostragens em um único ponto do reservatório (nas proximidades da captação de água) e dois períodos climáticos: período chuvoso (julho e agosto/06) e período seco (setembro a dezembro/06 e janeiro/07). Foram coletadas amostras para análise qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica.

Para análise qualitativa foram realizadas duas amostragens, uma fixada com formalina a 2% (250mL) e outra sem substância fixadora (1000mL), preservada à baixa temperatura, as quais foram adquiridas com rede de plâncton com abertura de malha de 25 µm.

As amostras destinadas à análise quantitativa (1000mL) foram coletadas na superfície do reservatório, com o auxílio de um recipiente de boca larga e fixadas com formalina a 2%.

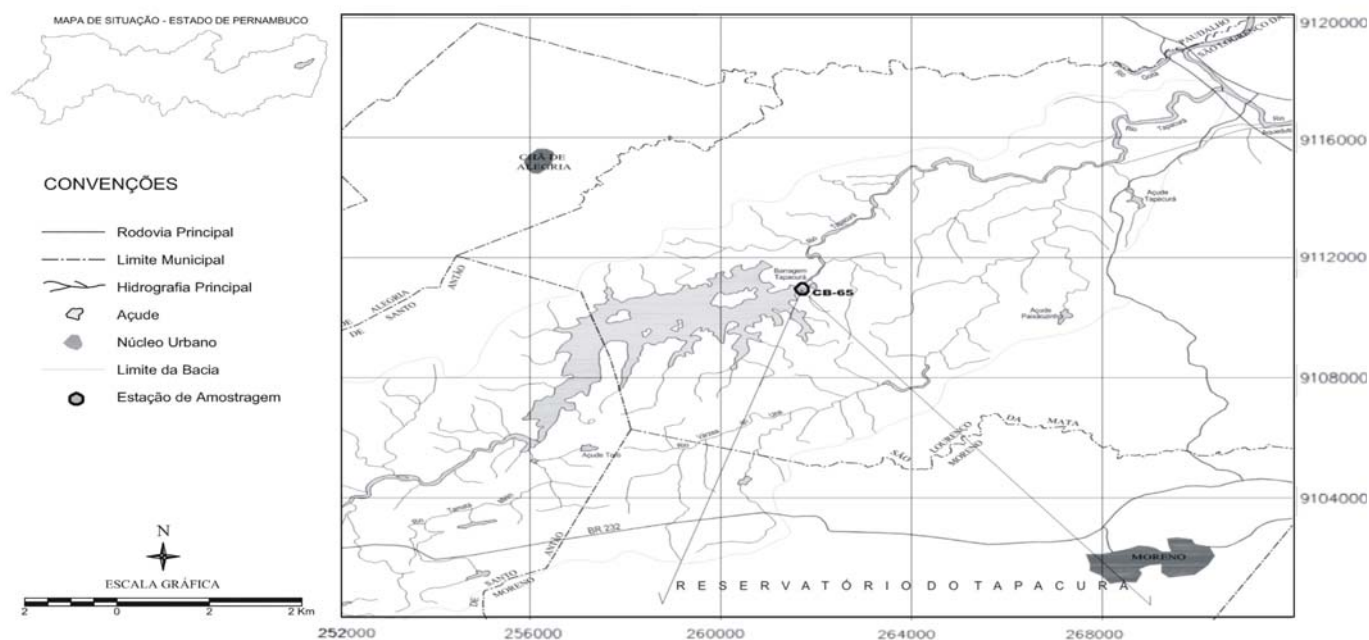


Figura 1. Mapa do reservatório de Tapacurá com localização da estação de amostragem

#### ■ Análise qualitativa

As análises qualitativas foram realizadas em microscópio óptico LEICA, modelo DME, em objetivas de 40 e 100X (à imersão) e oculares de 10X, dotada de retículo micrométrico. Foi utilizado nanquim para evidenciar bainha mucilaginosas em espécies de Cyanobacteria.

Os sistemas de classificação adotados foram: Round<sup>12,13</sup> para Chlorophyta, Chrysophyta e Euglenophyta, e, Anagnostidis & Komarék<sup>14,15</sup> e Komarék & Anagnostidis<sup>16,17</sup> para as Cyanobacteria.

Além dos estudos citados acima, no auxílio da identificação das Cyanobacteria foram utilizados os trabalhos de Anagnostidis & Komarék<sup>18,19</sup> e chave dicotômica<sup>20</sup> para determinação dos gêneros.

#### ■ Análise quantitativa

Para análise quantitativa as amostras foram homogeneizadas e acondicionadas em câmaras de sedimentação com volume de 5 mL por 24 horas. Posteriormente, foram conduzidas à análise em microscópio invertido Zeiss Axiovert 25-C, em objetiva de 40X e quantificadas seguindo o método de Utermöhl<sup>21</sup>.

O estudo quantitativo das Cyanobacteria foi baseado no guia da OMS<sup>22</sup> dando cumprimento

ao que determina o Artigo 17, § 1º, da portaria nº 518/GM de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde. Para as amostragens com floração de espécies coloniais foi adotado o método de digestão de colônias utilizando-se hidróxido de potássio (KOH a 0,03M)<sup>23</sup>, e posteriormente, as células foram quantificadas na área correspondente ao retículo de Wippler. O cálculo da densidade foi expressado em cel.mL<sup>-1</sup> a partir da fórmula descrita na American Public Health Association – APHA<sup>24</sup>.

#### ■ Tratamento dos dados

A frequência de ocorrência dos táxons foi determinada segundo Mateucci & Colma<sup>25</sup>, que definem as seguintes faixas de classificação: muito frequente (>70%), frequente (≤70% >40%), pouco frequente (≤40% >10%) e rara (<10%). A abundância e dominância foram determinadas de acordo com Lobo & Leighton<sup>26</sup>, sendo abundantes as espécies com valores superiores à média da comunidade e dominantes, aquelas cujo valor ultrapassa 50% da densidade fitoplanctônica total. Os índices de diversidade específica (bit.cél.<sup>-1</sup>) e equitabilidade foram aplicados a partir da metodologia proposta por Pielou<sup>27</sup>, utilizando-se o programa estatístico Diversity.

Os valores de densidade de Cyanobacteria foram comparados aos padrões propostos na resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005, para classificação de águas doces classe 2. O potencial de risco à saúde dos seres vivos, relacionados aos valores de densidade das Cyanobacteria no reservatório do Carpina, foi avaliado assumindo-se os níveis de alerta estabelecidos pela portaria N° 518/GM, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde e pelo guia da OMS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 22 táxons distribuídos em 5 divisões: Cyanobacteria (10), Chlorophyta (8) Chrysophyta (2) Euglenophyta (1) e Cryptophyta (1) (Tabela 1.). A riqueza de táxons observada no reservatório de Tapacurá foi baixa, com predomínio das Cyanobacteria (45 %) e Chlorophyta (36 %). Durante o estudo desenvolvido por Ferreira<sup>28</sup> no mesmo reservatório, as Cyanobacteria e Chlorophyta prevaleceram em riqueza de espécies. Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Bouvy et al.<sup>29</sup>, Falcão et al.<sup>30</sup>; Gomes<sup>31</sup> e Aragão et al.<sup>32</sup>, desenvolvidos em reservatórios do estado de Pernambuco, os quais evidenciaram maior representatividade para esses dois grupos fitoplanctônicos.

A densidade fitoplanctônica no Reservatório de Tapacurá durante o período estudado, apresentou uma variação de 7.200 cél.mL<sup>-1</sup> (julho/06) a 339.730 cél.mL<sup>-1</sup> (primeira amostragem de novembro/06). Durante este período foi observada uma tendência gradativa de crescimento da densidade, estabelecida a partir das amostragens de setembro/06, início de período seco, apresentando o maior pico na primeira coleta do mês de novembro/06, período de ocorrência das maiores temperaturas (Figura 2.). Esse “modelo de crescimento” fitoplanctônico é bastante comum em reservatórios eutróficos da região Nordeste, e também foram descritos nos trabalhos de Gomes<sup>31</sup> e Aragão<sup>32</sup> para o reservatório de Carpina-PE, sendo geralmente estabelecidos em função do aumento da temperatura e diminuição das precipitações.

As Cyanobacteria foram responsáveis pelas maiores densidades durante o período estudado, variando de 6.991 cél.mL<sup>-1</sup> (julho/06) a 336.857 cél.mL<sup>-1</sup> (primeira amostragem de novembro/06) (Figura 3.). Este grupo representou uma densidade média de 95,0 % da comunidade, seguido pelas Chrysophyta com 4,0%. A contribuição média da densidade das divisões Chlorophyta, Eugleno-

phyta e Cryptophyta somou 1,0 %. Durante o período estudado os táxons com as maiores densidades foram *Raphidiopsis mediterranea* Skuja, *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing e *Pseudanabaena catenata* Lauterborn, pertencentes às Cyanobacteria. A espécie *Microcystis aeruginosa* e o gênero *Pseudanabaena* apresentam histórico na produção de toxinas<sup>22</sup>. Além destes, outros gêneros e espécies observados no reservatório de Tapacurá são considerados potencialmente tóxicos: *Anabaena circinalis* Rabenhorst, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju, *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Anabaenopsis* e *Aphanizomenon*. O predomínio das Cyanobacteria em reservatórios tropicais eutróficos deve-se a um conjunto de fatores, como elevadas temperaturas, baixa precipitação, pH alcalino e altas concentrações de nutrientes, principalmente N e P<sup>33,34</sup>.

No presente estudo, com exceção da primeira (julho/06) e quarta (19 de setembro/06) amostragens, foi observado para as Cyanobacteria densidades acima de 50.000cél.mL<sup>-1</sup>, atingindo valores superiores a 100.000cél.mL<sup>-1</sup> a partir da segunda amostragem de outubro (Figura 3.). Estes valores estão em desacordo com a resolução N° 357 do CONAMA no que diz respeito às densidades máximas estabelecidas para as águas doces de classe 2. Quanto a Portaria N°518/GM os resultados observados durante o período citado acima, implicam o monitoramento semanal de cianotoxinas, além de enquadrar o reservatório de Tapacurá no nível 3 de alerta, que define os potenciais riscos para valores maiores que 100.000cél.mL<sup>-1</sup>. De acordo com o guia da OMS, o reservatório encontra-se no nível 2 de alerta, quando este apresenta densidades superiores a 20.000 cél.mL<sup>-1</sup> (Figura 3.).

As altas densidades observadas no reservatório de Tapacurá durante o período estudado são preocupantes. Os valores observados estabelecem potencial de risco à saúde pública, uma vez que já foi detectada a presença de saxitoxinas e anatoxina-a, durante florações provocadas por *Anabaena spiroides* Klebahn, *Pseudanabaena* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju e *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing em amostras coletadas nesse ambiente de março a maio de 2002<sup>9</sup>.

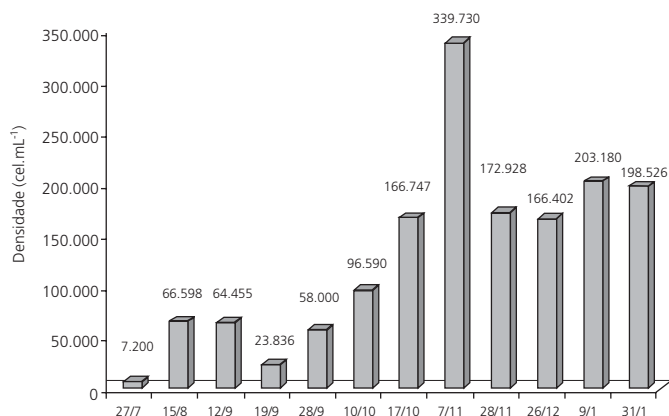
As Chrysophyta, representada pelas espécies *Navicula* sp. e *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, também apresentaram boa contribuição para densidade, com valores mais elevados durante o período seco. Esse grupo, que apresenta estrutura celular diferenciada, constituída por sílica e pectina, tende à sedimentação, apresentando maiores densidades nas

**Tabela 1.** Lista e frequência de ocorrência dos táxons identificados no reservatório de Tapacurá durante o período de julho/06 a janeiro/2007

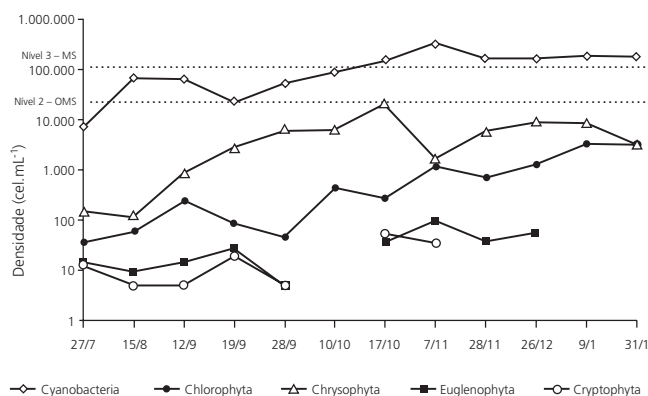
Lista dos táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Freq. (%)
<b>CYANOBACTERIA</b>													
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-100
<i>Coelosphaerium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	R-8
<i>Anabaena circinalis</i> Rabenhorst 1863	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-92
<i>Anabaenopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	R-8
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i> Lemmermann 1910	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	F-58
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju 1972	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-75
<i>Raphidiopsis mediterranea</i> Skuja 1937	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-100
<i>Geitlerinema amphibium</i> (C. Agardh) Anagnostidis 1989	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	PF-25
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	F-67
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1915	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	F-67
<b>CHLOROPHYTA</b>													
<i>Actinastrum</i> sp.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	PF-33
<i>Chlorella</i> sp.	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	F-50
<i>Golenkinia</i> sp.	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	F-67
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová 1969	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-92
<i>Scenedesmus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	PF-17
<i>Oocystis</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PF-17
<i>Closterium</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	PF-17
<i>Arthrodesmus</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PF-17
<b>CHRYSOPHYTA</b>													
<i>Navicula</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-100
<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen 1979	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MF-100
<b>EUGLENOPHYTA</b>													
<i>Trachelomonas volvocina</i> Ehrenberg 1833	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	F-75
<b>CRYPTOPHYTA</b>													
<i>Cryptomonas</i> sp.	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	F-58

MF: muito frequente; F: frequente; PF: pouco frequente; R: raro.

Legenda - data das amostragens: 1 - 27/7/06; 2 - 15/8/06; 3 - 12/9/06; 4 - 19/9/06; 5 - 28/9/06; 6 - 10/10/06; 7 - 17/10/06; 8 - 7/11/06; 9 - 28/11/06; 10 - 26/12/06; 11 - 9/1/07; 12 - 31/1/07.



**Figura 2.** Densidade fitoplanctônica no reservatório de Tapacurá-PE, durante o período compreendido entre julho de 2006 e janeiro de 2007.



**Figura 3.** Variação da densidade dos grupos fitoplanctônicos observados para o reservatório de Tapacurá-PE, durante o período compreendido entre julho de 2006 a janeiro de 2007, e indicação dos valores máximos permitidos para as Cyanobacteria no estabelecimento dos níveis de alerta tipo 2 da OMS e tipo 3 da portaria N°518/GM

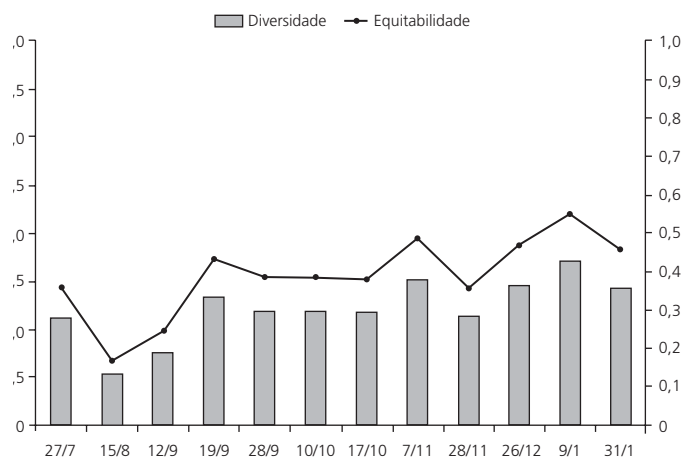
camadas mais profundas<sup>35</sup>. No entanto, a presença de imensos estandes de macrófitas aquáticas no reservatório de Tapacurá, principalmente das espécies *Pistia estratiotes* L. e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, atuaram como substrato para as Chrysophyta, possibilitando maiores densidades desse grupo nas camadas superficiais.

Quanto à frequência de ocorrência, dos 22 táxons identificados 32,0% foram considerados muito frequentes, 32,0% frequentes, 27,0% pouco frequentes e 9,0% raros (Tabela 1.). Dentre estes, destacaram-se *Raphidiopsis mediterranea* Skuja, *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing, *Navicula* sp. e *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, presentes em todas as amostras.

*Raphidiopsis mediterranea* Skuja, *Anabaena circinalis* Rabenhorst, *Microcystis aeruginosa* (Kutzing)

Kutzing, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju, *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Pseudanabaena catenata* Lauterborn, *Geitlerinema amphibium* (C. Agardh) Anagnostidis, *Navicula* sp. e *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen foram os táxons abundantes em pelo menos uma das amostragens (Tabela 2.) *Raphidiopsis mediterranea* e *Microcystis aeruginosa* foram as únicas espécies que apresentaram dominância entre o período estudado (Tabela 2.).

A diversidade específica variou entre baixa (valores entre 2,0 e 1,0 bits.cel<sup>-1</sup>) e muito baixa (< 1,0 bits.cel<sup>-1</sup>) durante o estudo, sendo os menores valores observados entre a fase de transição dos períodos seco (amostragem de agosto/07) e chuvoso (primeira amostragem de setembro/06). Os maiores valores ocorreram nas primeiras amostragens de novembro/06 e janeiro/07, quando ocorreram as densidades fitoplanctônicas mais elevadas, além do melhor equilíbrio quantitativo entre as espécies abundantes. Quanto à equitabilidade, com exceção da primeira amostragem de janeiro/07 (0,550), sugerindo melhor distribuição dos indivíduos entre as espécies, nos demais meses os valores apresentaram-se abaixo de 0,5 confirmando o domínio de poucas espécies (Figura 4.). Em reservatórios eutróficos é comum observar baixos valores para estes índices, pois as condições ambientais em situação de trofia tendem ao favorecimento de um pequeno número de espécies oportunistas e competitivas que se alternam na dominância da comunidade, formando altas densidades<sup>34,35</sup>.



**Figura 4.** Diversidade específica e equitabilidade da comunidade fitoplanctônica no reservatório de Tapacurá-PE, durante o período compreendido entre julho de 2006 e janeiro de 2007.



**Tabela 2.** Abundância (valores destacados sem negrito) e dominância (valores destacados com negrito) dos táxons identificados no reservatório de Tapacurá durante o período de julho/06 a janeiro/2007

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>CYANOBACTERIA</b>												
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1746	<b>53940</b>	15876	6825	7718	5054	5545	97972	12490	31706	7381	9890
<i>Coelosphaerium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3291
<i>Anabaena circinalis</i>	-	37	1259	1366	972	182	5145	87700	582	800	1436	927
<i>Anabaenopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	327
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	-	-	-	324	1000	600	-	836	-	2363	1109	1327
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	-	255	2301	19580	19580	2000	5018	18071	34633	48177
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	<b>4065</b>	12307	<b>46189</b>	<b>11992</b>	<b>38267</b>	<b>59358</b>	<b>109316</b>	65921	<b>107680</b>	<b>86791</b>	59358	<b>109716</b>
<i>Geitlerinema amphibium</i>	-	-	-	-	1083	-	-	-	-	-	67193	9363
<i>Planktothrix agardhii</i>	1181	125	-	125	-	-	727	3654	727	982	-	727
<i>Pseudanabaena catenata</i>	-	-	-	-	463	4909	3745	78774	39814	15235	19125	8217
<b>CHLOROPHYTA</b>												
<i>Actinastrum</i> sp.	-	-	19	-	9	-	-	-	-	18	-	91
<i>Chlorella</i> sp.	5	-	88	-	-	218	-	564	-	200	-	145
<i>Golenkinia</i> sp.	9	28	-	56	14	-	-	-	327	255	1400	1473
<i>Monoraphidium contortum</i>	19	32	-	14	9	200	91	527	382	818	1891	1309
<i>Scenedesmus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	764	200
<i>Oocystis</i> sp.	5	-	116	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Closterium</i> sp.	-	-	-	-	14	-	14	-	-	-	-	-
<i>Arthrodesmus</i> sp.	-	-	19	14	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CHRYSOPHYTA</b>												
<i>Navicula</i> sp.	93	88	676	2496	5936	6254	20362	218	309	509	4145	2691
<i>Aulacoseira granulata</i>	51	28	194	324	204	236	1963	1436	5563	8599	4745	654
<b>EUGLENOPHYTA</b>												
<i>Trachelomonas volvocina</i>	14	9	14	28	5	-	36	91	36	55	-	-
<b>CRYPTOPHYTA</b>												
<i>Cryptomonas</i> sp.	14	5	5	19	5	-	55	36	-	-	-	-
<b>Total</b>	7202	66599	64455	323838	58000	96591	166579	339729	172928	166402	203180	198525
<b>Média</b>	327	3027	2930	1084	2636	4391	7572	15442	7860	7564	9235	9024
<b>50%</b>	3601	33300	32228	11919	29000	48296	83290	169865	86464	83201	101590	99263

Legenda - data das amostragens: 1 - 2/7/06; 2 - 15/8/06; 3 - 12/9/06; 4 - 19/9/06; 5 - 28/9/06; 6 - 10/10/06; 7 - 17/10/06; 8 - 7/11/06; 9 - 28/11/06; 10 - 26/12/06; 11 - 9/1/07; 12 - 31/1/07.

## CONCLUSÃO

O estudo desenvolvido no reservatório de Tapacurá demonstrou que a comunidade fitoplanctônica esteve predominantemente, constituída por Cyanobacteria, sendo atribuídas a este grupo as maiores riquezas de espécie, frequências de ocorrência, abundância e dominância ao longo de todo o período estudado. Dentre os táxons inventariados, cinco espécies e dois gêneros apresentam histórico na produção de toxinas: *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing, *Pseudanabaena catenata* Lauterborn, *Anabaena circinalis* Rabenhorst, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju, *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Anabaenopsis* e *Aphanizomenon*. As elevadas densidades observadas para as Cyanobacteria, muitas vezes acima de 100.000 cel.mL<sup>-1</sup> e apresentando espécies potencialmente tóxicas, estabelecem potencial risco para a saúde pública, uma vez que já foram detectadas cianotoxinas no ecossistema em questão. Nesse sentido, considerando que o reservatório de Tapacurá-PE configura-se como um importante manancial de abastecimento do estado de Pernambuco e dando cumprimento ao que está normatizado no escopo da portaria Nº 518 do MS, de 25 de março de 2004, faz-se necessária a implementação de medidas de controle de Cyanobacteria e monitoramento de cianotoxinas, no sentido de prevenir possíveis transtornos que as florações desses organismos podem vir a ocasionar.

### AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN-PE, em nome da gestora Dra. Teresinha Tabosa, pela disponibilidade de toda a infraestrutura para o desenvolvimento da pesquisa. Aos prof.<sup>os</sup> Dr. Giulliani Lira e Msc. Cícero Tiago pela orientação e colaboração na realização deste trabalho, e à bióloga Nísia Aragão, companheira de bancada.

## REFERÊNCIAS

- Margalef R. *Limnologia*. Barcelona, Ediciones Omega; 1983. 1010.
- Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water*. 1ed. Londres: E & FN Spon 1999; p.15-37.
- Azevedo SMFO, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. First report of microcystins from a Brazilian isolated the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Jornal of Applied Phycology* 1994, 6:61-5.
- Vieira JMS. Toxicidade de cianobactérias e concentração de microcistinas em uma represa de abastecimento público da região amazônica de Brasil [Tese de Doutorado]. São Paulo, SP, Universidade de São Paulo, 2002. 147pp.
- Oliver RL, Granf GG. Freshwater blooms. In: Whitton BA, Potts M.(Ed). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Dordrecht: Kluwer; 2000. p.149-94.
- Brasil. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-9.
- Molica RJR, Onodera H, Gárcia C, Rivas M, Andrinolo D, Nascimento S, Meguro H, Oshima Y, Azevedo SMFO, Lagos N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobhyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*. 2002; 41(6). 606-11.
- Teixeira MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Gastroenteritis Epidemic in the Area of the Itaparica, BA, Brazil. *Bulletin of PAHO*1993, 27(3).244-53.
- Molica RJR, Oliveira EJA, Carvalho PVVC, Costa ANSE, Cunha MCC, Melo GL, Azevedo SMFO. Occurrence of saxitoxins and na anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 2005, 4. 743-53.
- Braga RAP. Universidade Federal de Pernambuco/ CTG / DECIVIL / GRH. Gestão ambiental da bacia do rio Tapacurá – Plano de ação; 2001.
- The Weather Channel. Disponível em URL: <http://br.weather.com/weather/ climatology /BRxx1479?dayofyear=182>. Acesso em 18.11.2006.
- Round FE. *The biology of the algal*. London: Edward Arnold (Publishers). Ltd.; 1965. 269.
- Round FE. *The taxonomy of the Chlorophyta*, 2. *Brit. phycol. J*; 1971. 6(2).235-64.
- Anagnostidis K, Komárek J. Modetn approach to the classification system of Cyanobacteria. 3-Oscillatoriales. *Arch Hydrobiol suppl algol Stud* 1988, 80(1-4).327-472.
- Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of Cyanobacteria. 5- Stigonematales. *Arch Hydrobiol suppl algol Stud* 1990, 59. 1-73.
- Komárek J, Anagnostidis K. Modern appoach to the classification system of Cyanophytes, 2: Choococcales. *Archiv fur Hydrobiologie, Suppl.* 73, *Algological Studies*1986, 43. 157-226.
- Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota, 2. Teil: Oscillatoriales. *Subwasserflora von Mitteleuropa*. Bridel B, Gaster G, Krienitz L, Schargerl M. (Hrs.) (19/2). Elsevier. 2005. p.759.
- Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl HG, Gartner H, Heynig & D. Mollenhauer Ettl (eds): *Susswasserflora von Mitteleuropa*; Gustav Fischer, Stuttgart 1999, 19. 1-545.
- Komárek J, Kling H. Variation in six planktonic cyanophyte genera in lake Victoria (East Africa). *Archiv fur Hydrobiologie, Stuttgart* 1991, 88. 21-46.
- Sant'Anna CL, Azevedo MTP, Agujaro L. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas

- continentais brasileiras. 1ªed. Interciência, São Paulo, SP; 2006, 58pp.
21. Utermöhl H. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton – Methodik. *Mitt Int Limnol* 1958, 9. 1-38.
  22. Chorus I, Bartram J. Editors. Toxic Cyanobacteria in water. A Guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon; 1999. 416pp.
  23. Box JD. Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. In: Chorus I & Bartram J. Toxic cyanobacteria in water. 1ed. Londres: E & FN Spon; 1999. p.347- 67.
  24. American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16ª Ed. Washington; 1985. p.1088-101.
  25. Mateucci SD, Colma A. La metologia para el estudio da vegetación. *Colection de Monografías Científicas. Série Biología*; 1982. 22. 168.
  26. Lobo E, Leighton G. Estructuras comunitárias de lãs fitocenosis planctônicas de los sistemas de desembocaduras de rios e y esteros de la zona central de Chile. *Revista Biología Marinha* 1986, 22. 1-29.
  27. Pielou EC. *Mathematical ecology*. Wiley-Interscience, New York; 1977. 385.
  28. Ferreira ACS. Dinâmica do fitoplâncton de um reservatório hipereutrófico (Reservatório Tapacurá, Recife, PE), com ênfase em *Cylindrospermopsis raciborskii* e seus morfotipos [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
  29. Bouvy M, Barros-França L, Carmouze JP. Compartimento microbiano no meio pelágico de sete açudes do Estado de Pernambuco (Brasil). São Paulo, *Acta Limnológica Brasileira*, 1998, 10. 93-101p.
  30. Falcão DPM, Bouvy M, Marinho M, Moura AN. Microfitoplâncton e condições limnológicas em reservatórios de cinco bacias hidrográficas do Estado de Pernambuco: ênfase ao gênero *Cylindrospermopsis*. In: Reunião Brasileira de Ficologia, 8. Porto de Galinhas, PE 1999. Resumos... 120p.
  31. Gomes CTS. Análise da Variação quali-quantitativa do fitoplâncton no reservatório do Carpina – PE [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 2003.
  32. Aragão NKC, Gomes CTG, Lira GAST, Andrade CM. Estudo da comunidade fitoplanctônica no reservatório da Carpina-PE, com ênfase em cyanobacteria. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2007; 66(3). 240-8.
  33. Bouvy MA, Falcão D, Marinho M, Pagano M, Moura A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbiol Ecology* 2000; 23.13-27.
  34. Chellappa NT, Costa MAM. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica* 2003, 24. 3-10.
  35. Reynolds CS. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge, Cambridge University Press, 1984. p 384.

## Frequência de diagnóstico de lesões do colo uterino por faixa etária em mulheres atendidas no Programa de Rastreamento Viva Mulher no período de 2004 a 2008

Review on the occurrence of uterine cervix lesions according to age group among women enrolled in the Viva Mulher – Prevention Program during the period from 2004 to 2008

RIALA6/1199

Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO\*<sup>1</sup>, Sonia Maria Miranda PEREIRA<sup>1</sup>, Daniela ETLINGER<sup>1</sup>, Luciana Silva AGUIAR<sup>1</sup>, Yuriko Ito SAKAI<sup>1</sup>, Neuza Kasumi SHIRATA<sup>1</sup>, Mariete dos Santos TEIXEIRA<sup>1</sup>, Celso di LORETO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, Seção de Anatomia Patológica, Av. Dr. Arnaldo 355, 7º andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: lyamamot@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup>Seção de Anatomia Patológica, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 01.04.2009 – Aceito para publicação: 28.04.2009

### RESUMO

No presente estudo foi realizado o levantamento retrospectivo de diagnóstico citopatológico das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas pela método de Papanicolaou e sua distribuição por faixa etária das mulheres atendidas no período de 2003 a 2008. Das 222.024 amostras analisadas, 3.674 (1,65%) foram classificadas como insatisfatórias, 206.439 (92,98%) foram negativas e 11.911 (5,36%) apresentaram algum tipo de atipias nucleares. Dentre as alterações epiteliais atípicas, 6.437 (54,04%) foram de ASC-US e 210 (1,76%) de ASC-H; 3.264 (27,40%) de LSIL; 1.279 (10,74%) de HSIL; 131 (1,10%) de SCC; 552 (4,63%) por AGC-US e 23 (0,19%) de AGC-H; 7 (0,06%) de AIS e 8 (0,07%) de ADENOCA. Quanto à ocorrência e distribuição dos diagnósticos de lesões intraepiteliais escamosas e glandulares, de acordo com a faixa etária em intervalos de 5 anos, foi observada maior frequência de diagnóstico de LSIL entre as mulheres mais jovens (15-25 anos) e os diagnósticos de ASC-US, ASC-H, AGC-US, HSIL, SCC e ADENOCA nas mulheres >50 anos de idade. As alterações glandulares, como AGC-H e AIS, ocorreram em mulheres na faixa etária entre 30-34 e 45-49 anos. Foram detectados dois (0,16%) casos de HSIL em pacientes <14 anos e em 51 (3,99%) pacientes na faixa entre 15-19 anos. Os dados da presente avaliação enfatiza a importância de campanhas orientativas, rastreamento e seguimento das pacientes para garantir a melhoria e a efetividade dos programas de prevenção.

**Palavras-chave.** rastreamento citológico, esfregaço cervical, método de Papanicolaou, faixa etária.

### ABSTRACT

The retrospective study on cervico-vaginal smears analyzed by Papanicolaou (Pap) test at Instituto Adolfo Lutz – Division of Pathology, during the period from 2003 to 2008, was carried out. The diagnoses of pre-neoplastic and neoplastic lesions on Pap smears were analyzed, according to the age groups distribution. Of the 222,024 analysed samples, 3,674 (1.65%) were classified as unsatisfactory, 206,439 (92.98%) were negative and 11,911 (5.36%) presented abnormal cytology diagnoses. Of those with abnormal cytology, 6,437 (54.04%) were classified as ASC-US, 210 (1.76%) as ASC-H, 3,264 (27.40%) as LSIL, 1,279 (10.74%) as HSIL, 131 (1.10%) as SCC and 552 (4.63%) as AGC-US, 23 (0.19%) as AGC-H, 7 (0.06%) as AIS, and 8 (0.07%) were diagnosed as ADENOCA. The distribution of the squamous and glandular intraepithelial lesions diagnosis in the age group ranging at 5-year intervals, showed the major frequency of LSIL among younger women (15-25 years of age), and the diagnoses of ASC-US, ASC-H, AGC-US, HSIL, SCC and ADENOCA among >50 year- old women. The glandular variations as AGC-H and AIS occurred in women at of 30-34 and 45-49 age groups. Two (0.16%) women with HSIL were under 14 years of age, and 51 (3.99%) were from 15 to 19 years old. This study emphasizes the relevance in implementing the educational campaigns, the patients screening and follow-up protocols for assuring the improvement and the effectiveness of prevention programs.

**Key words.** cytology screening, cervical smears, Pap test, age group.

## INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres por ano e sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos comparado com os mais desenvolvidos<sup>1</sup>. Aproximadamente 80% dessas mortes ocorreram nos países em desenvolvimento<sup>2</sup>. Nos países desenvolvidos, onde os programas de rastreamento organizados foram implantados, a incidência de câncer cervical tem diminuído. Entretanto nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos que não têm acesso a programas de rastreamento efetivos, o câncer cervical ainda é um dos maiores problema de saúde<sup>2,3</sup>. Desde 1998, o Ministério da Saúde segue recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que propõe um exame citológico cervical (Papanicolaou) a cada três anos em mulheres de 25 a 59 anos de idade<sup>4</sup>.

O rastreamento populacional abrangente e constante pelo exame de Papanicolaou está associado a uma redução da mortalidade em mais de 70% em relação às populações fora da cobertura<sup>5</sup>. Provavelmente este efeito se deve ao grande número de mulheres nas quais foi detectada doença em estádios mais precoces, em que as chances de cura são maiores, como: lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL), atípicas escamosas ou glandulares de significado indeterminado nas quais não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H e ASG-H, respectivamente) ou adenocarcinoma *in situ* (AIS)<sup>6</sup>.

O exame de Papanicolaou tem sido a principal ferramenta na prevenção de câncer cervical há mais de cinquenta anos, o que proporcionou quedas expressivas na incidência e mortalidade por esta doença em muitos países<sup>7</sup>. Essa tendência foi atribuída aos programas de rastreamento por este método difundido em muitos países. A acurácia deste exame em detectar anormalidades citológicas tem sido bastante questionada por apresentar sensibilidade bastante variável (30% a 87%) e especificidade entre 86% e 100%<sup>8</sup>, pelo método convencional. A real sensibilidade é de aproximadamente 60% em programas de rastreamento rotineiro<sup>9</sup>.

Para melhorar o desempenho dos exames citopatológicos é necessário implementar programas de controle de qualidade interno (CQI) e externo na rotina diagnóstica, com o objetivo de reduzir resultados falso-negativos<sup>10,11</sup>. O CQI deve compor um conjunto de ações

sistematizadas e realizadas regularmente, que abrange o monitoramento da adequabilidade da amostra, revisão hierárquica dos esfregaços e revisão dos casos negativos. A revisão dos esfregaços pela metodologia do roteiro de critérios de risco (RCR) avalia as informações clínicas relevantes, antecedentes e sintomas que podem ser associados aos riscos para lesões cervicais<sup>12,13</sup>. A técnica de revisão dos esfregaços prévios negativos é o método CQ recomendado pela Academia Internacional de Citologia<sup>14</sup> e, no Brasil, o Monitoramento Externo de Qualidade (MEQ) foi elaborado a partir de recomendações do Instituto Nacional do Câncer (INCA), com intuito de oferecer aos laboratórios da Rede Pública uma avaliação de desempenho nos diagnósticos citológicos do colo uterino e fornecer fomentos para educação continuada<sup>15</sup>.

O Programa de Prevenção do câncer de colo uterino tem sido uma estratégia bastante eficaz para o rastreamento do câncer cervical. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição dos diagnósticos citopatológicos das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino, por faixa etária, pertencentes à rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado levantamento retrospectivo dos diagnósticos pelo método de Papanicolaou em esfregaços cérvicovaginais, provenientes de mulheres que realizaram exames pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no período de novembro de 2003 a outubro de 2008 avaliados pelo Setor de Citologia Oncótica da Divisão de Patologia, no Instituto Adolfo Lutz. As amostras foram coletadas com espátula de Ayre e/ou *citobrush*, fixadas em polietilenoglicol (Carbowax), nas Unidades de Saúde, e coradas pelo Método de Papanicolaou em nosso laboratório. A classificação utilizada para o diagnóstico dos exames de Papanicolaou no período de 2004 a 2006, foi de acordo com o *Bethesda System*, 2001. A partir de 2007, por recomendação do Instituto INCA, passou-se a utilizar a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e condutas preconizadas<sup>16</sup>. Com a nova nomenclatura, foram incluídas as subdivisões das atípicas escamosas/glandulares de significado indeterminado (ASC-US; AGC-US), não se podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H/AGC-H) respectivamente.

Neste período de cinco anos, 222.024 amostras cérvicovaginais foram submetidas à avaliação pré-analítica sobre a adequabilidade da amostra para análise segundo



critérios recomendados pelo Ministério da Saúde (MS)<sup>12</sup> e pelos critérios estabelecidos no laboratório. A avaliação analítica inclui os diagnósticos descritivos como: dentro dos limites da normalidade/ alterações celulares benignas reativas ou reparativas; ou classificadas como atípicas em diferentes graus. Em todos os casos foi avaliada também a microbiologia.

Para garantia da qualidade dos diagnósticos citopatológicos, o Setor de Citologia Oncótica realiza revisão das amostras como rotina, há mais de 15 anos pelo CQI através da metodologia RCR com considerações clínicas relevantes e citológicas, segundo recomendação do INCA<sup>12</sup> e revisão de 10% (R10%) dos diagnósticos negativos selecionados aleatoriamente<sup>14,15</sup>. Pela metodologia do RCR, foram selecionadas amostras com base nas considerações clínicas da requisição de solicitação do exame: amostras consideradas inadequadas para análise; amostras com diagnósticos suspeitos entre outras. Também foram realizadas revisões de esfregaços cervicais prévios negativos em mulheres com diagnóstico de ASC-H, HSIL, SCC, AGC-H, AIS, ADENOCA e SCC<sup>14</sup>. Os diagnósticos provenientes de mulheres com idade <14 anos a >50 anos e inclusive as sem idade (s/idade) do período de 2004 a 2006, foram compilados por faixa etária em intervalos de cinco anos, analisados conforme a distribuição e comparados ano/ano.

## RESULTADOS

No total de 222.024 amostras analisadas no período de novembro de 2003 a outubro de 2008, a classificação das amostras foi: 3.674 (1,65%) insatisfatórias, com variação de 0,59% (2005) a 2,82% (2008); 206.439 (92,38%) negativas, com variação de 89,23% (2008) a 94,42% (2005) e 11.911 (5,37%) com algum grau de atipia nuclear (Tabela 1). Dentre os 11.911 casos com alterações epiteliais atípicas, 6.647 (54,04%) apresentaram atipias escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASC-US) e 210 (1,76%) mostraram atipias escamosas de significado indeterminado, nas quais não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H); 3.264 (27,40%) lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), 1.279 (10,74%) lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); 131 (1,10%) carcinoma de células escamosas (SCC); 552 (4,63%) atipias glandulares de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas ou (AGC-US), 23 (0,19%) atipias glandulares de significado indeterminado, nas quais não se pode afastar lesão de alto grau (AGC-H),

7 (0,06%) adenocarcinoma in situ (AIS) e 8 (0,07%) adenocarcinoma (ADENOCA) (Tabela 2).

A distribuição dos diagnósticos das lesões intraepiteliais escamosas e glandulares, por faixa etária com intervalos de 5 anos, apresentou maior frequência entre LSIL nas mulheres mais jovens (17,25%, 22,79% e 16,91%) no intervalo entre 15-29 anos de idade respectivamente e os casos de ASC-US, ASC-H, HSIL, SCC, AGC-US e ADENOCA nas mulheres > 50 anos. Já as alterações glandulares como AGC-H e AIS foram detectadas em mulheres na faixa etária entre 30-34 e 45-49 anos. Foram detectados 2 (0,16%) casos de HSIL em pacientes <14 anos e 51 (3,99%) casos na faixa etária entre 15-19 anos.

O CQI revisou neste período de cinco anos 21% das amostras citopatológicas, sendo que 9% foi pela técnica de R10% e 12% pelo RCR.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nos países em desenvolvimento o câncer cervical ainda é um problema de saúde pública. Provavelmente isso se deve a limitações de recursos ou programas de rastreamentos deficientes, tornando difícil a identificação do grupo etário alvo para cobertura desses programas<sup>17</sup>. No Brasil, após a implantação do Programa “Viva Mulher” em 1998, o INCA exerce um importante papel na elaboração de normas e rotinas, bem como gera planejamento estratégico para o programa<sup>18</sup>.

Apesar das controvérsias nos últimos anos, sobre a sensibilidade e especificidade do método de Papanicolaou em programas de rastreamento<sup>8</sup>, este ainda tem demonstrado ser eficaz na prevenção do câncer de colo uterino. Para garantir a eficácia dos resultados dos exames citopatológicos, foi realizada a rejeição da amostra na fase pré-analítica segundo critérios recomendados pelo MS<sup>12</sup>; utilizamos também critérios estabelecidos pelo Setor de Citologia Oncótica<sup>19</sup>, implementados a partir do programa de controle de qualidade interno e externo, bem como a capacitação e treinamento de novas metodologias<sup>20</sup>. O CQI realizado pela metodologia do RCR é considerado mais sensível do que a revisão aleatória de 10% na otimização em detectar lesões precoce do câncer do colo do útero<sup>10,13</sup>.

No período analisado, amostras insatisfatórias foram detectadas em 1,65% dos casos. Em estudo anterior, os autores relatam 2,54% de amostras insatisfatórias no período de 2005 a 2007, nas quais as principais causas foram:

**Tabela 1.** Distribuição dos 222.024 diagnósticos citopatológicos cervicovaginais realizados no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz - SP, no período de nov. 2003 a out. 2008

	2004		2005		2006		2007		2008		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Insatisfatório	724	1,129	352	0,592	1120	2,653	765	2,478	713	2,817	3674	1,655
Negativo	60254	93,949	56178	94,425	39168	92,782	28254	91,529	22585	89,234	206439	92,980
ASC-US	1505	2,347	1668	2,804	1086	2,573	973	3,152	1205	4,761	6437	2,899
ASC-H	0	0	0	0	0	0	72	0,233	138	0,545	210	0,095
LSIL	912	1,422	853	1,434	588	1,393	510	1,652	401	1,584	3264	1,470
HSIL	529	0,825	286	0,481	157	0,372	157	0,509	150	0,593	1279	0,576
SCC	65	0,101	32	0,054	14	0,033	9	0,029	11	0,043	131	0,059
AGC-US	141	0,220	121	0,203	79	0,187	114	0,369	97	0,383	552	0,249
AGC-H	0	0	0	0	0	0	14	0,045	9	0,036	23	0,010
AIS	2	0,003	2	0,003	1	0,002	1	0,003	1	0,004	7	0,003
ADENOCA	3	0,005	3	0,005	2	0,005	0	0	0	0	8	0,004
<b>Total</b>	<b>64135</b>	<b>100</b>	<b>59495</b>	<b>100</b>	<b>42215</b>	<b>100</b>	<b>30869</b>	<b>100</b>	<b>25310</b>	<b>100</b>	<b>222024</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Distribuição dos 11.911 diagnósticos citopatológicos cervicais com alterações atípicas, realizados no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz - SP, por faixa etária de intervalos de cinco anos

	ASC-US		ASC-H		LSIL		HSIL		SCC		AGC-US		AGC-H		AIS		ADENOCA			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
< 14	23	0,36	0	0	26	0,80	2	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15-19	523	8,12	8	3,81	563	17,25	51	3,99	0	0	15	2,72	1	4,35	0	0	0	0	0	
20-24	916	14,23	21	10,00	744	22,79	123	9,62	0	0	24	4,35	2	8,70	0	0	0	0	0	
25-29	878	13,64	27	12,86	552	16,91	193	15,09	5	3,82	47	8,51	2	8,70	0	0	0	0	0	
30-34	691	10,73	22	10,48	416	12,75	214	16,73	7	5,34	70	12,68	5	21,74	2	28,57	0	0	0	
35-39	680	10,56	23	10,95	316	9,68	179	14,00	16	12,21	79	14,31	2	8,70	1	14,29	0	0	0	
40-44	631	9,80	22	10,48	233	7,14	178	13,92	19	14,50	87	15,76	2	8,70	1	14,29	0	0	0	
45-49	570	8,86	13	6,19	180	5,51	88	6,88	15	11,45	81	14,67	6	26,09	2	28,57	0	0	0	
> 50	1505	23,38	74	35,24	222	6,80	243	19,00	67	51,15	146	26,45	3	13,04	1	14,29	7	87,50	0	
s/ idade	20	0,31	0	0	12	0,37	8	0,63	2	1,53	3	0,54	0	0	0	0	1	12,50	0	
<b>Total</b>	<b>6437</b>	<b>100</b>	<b>210</b>	<b>100</b>	<b>3264</b>	<b>100</b>	<b>1279</b>	<b>100</b>	<b>131</b>	<b>100</b>	<b>552</b>	<b>100</b>	<b>23</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

artefato de dessecamento, presença de piócitos, material insuficiente, presença de sangue e superposição celular<sup>19</sup>.

Neste estudo, observou-se que a frequência de LSIL foi maior na faixa etária entre 20 a 24 anos (22,79%), que corrobora os dados da literatura em que as lesões de baixo grau se concentram nas faixas etárias entre 15 a 29 anos, com aumento significativo na faixa de 20 a 24 anos, não priorizada pelo Programa<sup>21,22,23</sup>. A classificação ASC-H foi introduzida pelo Sistema de Informação do câncer do colo do útero (SISCOLO) a partir de 2006 e compilados a partir de 2007<sup>18</sup>; nestes dois anos foram detectadas estas alterações em 0,09% dos casos; estudos anteriores relatam taxa de 0,3% de ASC-H<sup>22,24</sup>. Barret et al.<sup>24</sup> observaram que em 72% das pacientes com diagnóstico de ASC-H, apresentaram correlação cito-histológica de HSIL confirmando assim, a associação desta categoria diagnóstica com o risco para câncer cervical.

Alguns autores relatam que a taxa de exames com anormalidades é menor nas mulheres com maior idade<sup>25,26</sup>. Em nosso estudo, os diagnósticos mais frequentes nas mulheres acima de 50 anos foram de ASC-US/H, AGC-US, HSIL, SCC e ADENOCA. Estes achados enfatizam a importância da realização do exame de Papanicolaou periódico em mulheres na perimenopausa, devido à proporção significativa de lesões precursoras desenvolvidas neste grupo de idade<sup>6,17</sup>.

O conjunto dos achados diagnósticos através de lesões em fases iniciais, consideradas precursoras do câncer do colo de útero, desempenha importante papel no processo de evolução da doença<sup>17</sup>. Resultados indicam que tais lesões estão se apresentando mais frequentemente em mulheres mais jovens (25 anos)<sup>23,27</sup>. Em nossa casuística são relatados dois casos de HSIL em pacientes <14 (0,16%) e 51 (3,99%) na faixa etária entre 15-19 anos. Em estudo anterior Yamamoto et al.<sup>21</sup> relataram 0,25% e 3,62% respectivamente nestas mesmas faixas etárias. Os resultados do presente estudo mostram que a frequência dos diagnósticos atípicos vem aumentando progressivamente ao longo dos últimos anos, e em maior proporção na população mais jovem; as lesões escamosas de alto grau (ASC-H, HSIL, SCC) são mais frequentes nas mulheres > 50 anos. Já as lesões glandulares de alto grau (AGC-H e AIS) aparecem predominantemente nas mulheres da faixa etária entre 30-34 anos (Tabela 2). Os dados apontam que a realização periódica do exame de Papanicolaou ainda é o melhor meio para a detecção de lesões pré-neoplásicas, mesmo com as limitações de cobertura populacional de rastreamento<sup>20,21,22,23</sup>. Por outro lado, estudiosos de países

desenvolvidos tecem críticas severas quanto à sensibilidade limitada do método citológico<sup>17</sup>.

Alguns tipos de Papilomavirus humano (HPV), nos últimos anos, têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de neoplasias nas regiões que comumente infectam, compreendendo na mulher, principalmente a região genital. Estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular demonstram presença do DNA-HPV (tipos 16 e 18) em mais de 99,7% dos casos de câncer cervical e atualmente já está bem estabelecido que a infecção pelo HPV é o fator central e causal do câncer do colo do útero<sup>28</sup>. A transmissão do HPV ocorre através do contato sexual, sendo assim, é de extrema importância educar a população quanto ao modo de transmissão. Para isso é necessário enfatizar os métodos preventivos, bem como os comportamentos de risco. A educação visa tanto a prevenção quanto à detecção precoce da doença<sup>28,29</sup>.

Concluimos que o método de Papanicolaou é importante ferramenta para a detecção do câncer de colo uterino, principalmente quando realizado sob rigoroso controle de qualidade interno e externo. Nossos dados reforçam a necessidade de campanhas orientativas, *follow-up* das pacientes e planejamento de futuras ações para a melhoria e efetividade dos programas de prevenção das doenças sexualmente transmissíveis.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade do câncer no Brasil. 2008, Rio de Janeiro [acesso em 24/04/09]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2008/>
2. Ferlay JFB, Pisaniand P, Parkin DM. GLOBOCON 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase Nº 5, Version 2.0 Lyon: IARC Press, 2004.
3. WHO. Control of cancer of cervix uteri. A WHO meeting. Bull WHO 1986; 64: 761-9.
4. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Consenso de periodicidade e faixa etária no exame de prevenção do câncer cérvico-uterino, 1988. Rev Bras Cancerol. 1989; 35(1/2):77.
5. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. Lancet. 2004; 364(9430): 249-58.
6. Calazan C, Luis RR, Ferreira I. O diagnóstico do cancer do colo uterino invasor em um Centro de Referência Brasileiro: Tendência temporal e potenciais fatores relacionados. Rev Bras Cancerol. 2008; 54(4): 325-31.

7. Hankey BF, Ries LA, Edwards BK. The surveillance, epidemiology, and end results program. A National Resource. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.* 1999; 8: 1117-21.
8. Nanda K, Mccrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities. *Ann Intern Med.* 2000, 132(10): 810-9.
9. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol.* 1995; 141: 680-9.
10. Renshaw AA. Accurate and precise methodologies for routine determination of false-negative rate of Papanicolaou smear screening. *Cancer Cytopathol.* 2001; 93: 86-92.
11. Ferraz MGMC, Agnol MD, di Loreto C, Pirani WM, Utgawa ML, Pereira SMM, Sakai YI, Feres CL, Shih LWS, Yamamoto LSU, Rodrigues ROL, Shirata NK, Longatto-Filho A. 100% rapid rescreening for quality assurance in a quality control program in a public health cytology laboratory. *Acta Cytol.* 2005; 49(6): 639-43.
12. Ministério da Saúde. Prevenção do câncer do colo do útero. Manual Técnico para Laboratórios. Brasília (DF); 2002.
13. Tavares SBN, Amaral RG, Manrique EJC, Sousa NLA, Albuquerque ZBP, Zeferino LC. Controle de qualidade em citopatologia cervical: revisão de literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2007; 53(3): 355-64.
14. CLIA 88: Centers for Disease Control: regulations for implementing clinical laboratory improvement of 1988: A summary. *J Am Med Assoc.* 1992; 267: 1725-34.
15. Pereira SMM, Ramos DEL, Yamamoto LSU, Shirata NK, di Loreto C, Ferraz MGMC, Longatto-Filho A e grupo de cols. Monitoramento externo de qualidade em citopatologia cervical e o reflexo na rotina dos laboratórios da rede pública. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 2006; 18(3): 172-7.
16. Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(5): 351-73.
17. Gupta S, Sodhani P, Halder K, Chachra KL, Singh V, Sehgal A. Age trends in pre-cancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in a cytology screening program: what should be the target age group for a major thrust of screening in resource-limited settings. *Cytopathol* 2008; 19: 106-10.
18. Instituto Nacional de Câncer. Implantando o Viva Mulher – Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama. Rio de Janeiro (Brasil): Instituto Nacional de Cancer; 2001.
19. Ducatti C, Ramos DEL, Gomes LP, Aguiar LS. Não-conformidades em exames citopatológicos: um problema no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino. *J Bras Patol Med Lab.* 2008; 44(2): 116.
20. Pereira SMM, Yamamoto LSU, di Loreto C, Silva LA, Makabe S, Marques JA, Maeda MYS, Santoro CL, Utgawa ML, Longatto-Filho A. O impacto do diagnóstico citológico de atipias indeterminadas no Sistema Público de Saúde. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 2005; 17(4): 251-4.
21. Yamamoto LSU, Saito S, Pereira SMM, Utgawa ML, Longatto-Filho A. Uterine Cytopathology in a public health laboratory: impact from 20 years data (1984-2003). *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2006; 65(2): 141-5.
22. Etlinger DLR, Pereira, SMM, Oikawa KF, Marin AC, Araujo RS, Souza CJ, Yamamoto LSU. Campanha de prevenção de câncer cervical: estudos no Instituto Adolfo Lutz mostram a necessidade de avaliação na faixa etária. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2008; 67(1): 64-8.
23. Cabral MDB, Feitosa TMP, Figueiredo RM, Almeida RT. Análise do rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Rio de Janeiro. 2008. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.
24. Barret D, Schepansky A, Capstick V, Johnson G, Steed H, Faught W. Atypical squamous cells-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H): A result not to be ignored. *Gynecol.* 2006; 1095-8.
25. Rader AE, Rose PG, Rodriguez M, Mansbacher S, Pitlik D, Abdul-Karim FW. Atypical squamous cells of undetermined significance in women over 55. Comparison with the general population and implications for management. *Acta Cytol* 1999; 43(3): 357-62.
26. Kaminski PF, Stevens CWJ, Wheelock JB. Squamous atypia on cytology. The influence of age. *J Reprod Med.* 1989; 34: 617-20.
27. Longatto-Filho A, Etlinger D, Gomes NS, Cruz SV, Cavalieri MJ. Frequencia de esfregaços cervico-vaginais anormais em adolescentes e adultas: revisão de 308.630 casos. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2003; 62(1): 31-4.
28. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; 14: 40470.
29. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J.* 2001; 164(7): 1017-25.



# Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados

## Citral antifungal activity against *Candida* genus yeasts isolated from hospitalized patients

RIALA6/1198

Tatiane Morais FERREIRA<sup>1</sup>, Fernando de Sá SILVA<sup>2\*</sup>, Guilherme Rodrigues TEODORO<sup>1</sup>, Ana Carolina Borges Pereira da COSTA<sup>1</sup>, Aguida MARIA<sup>3</sup>, Milton BELTRAME JÚNIOR<sup>4</sup>, Sônia KHOURI<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

CEP: 05503-900, e-mail: silvafs@gmail.com

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

<sup>2</sup>Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Taubaté, Taubaté, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brasil.

Recebido: 01.10.2008 – Aceito para publicação: 12.02.2009

### RESUMO

O citral, componente do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, tem sido pesquisado para verificar sua ação antimicrobiana em bactérias e fungos. Com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica do citral contra leveduras do gênero *Candida*, no presente trabalho foram avaliadas 32 amostras de *Candida albicans*, 25 de *C. tropicalis*, 20 de *C. parapsilosis* e 5 de *C. glabrata*, coletadas de pacientes hospitalizados. O citral foi testado nas concentrações de 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60% (v/v), utilizando a técnica de difusão em ágar Sabouraud. A atividade antifúngica do citral foi constatada em todas as leveduras selecionadas nas concentrações  $\geq 25\%$ . Mediante os resultados obtidos, sugere-se a realização de novas pesquisas sobre citral frente às demais espécies de fungos patogênicos para conhecer as características toxicológicas e farmacológicas para que esse componente possa futuramente ser utilizado como um importante princípio ativo na produção de novos agentes antifúngicos.

**Palavras-chave.** citral, *Candida* sp, leveduras, fungos e infecção hospitalar.

### ABSTRACT

Citral is the *Cymbopogon citratus* essential oil compound which has been investigated to verify its antimicrobial activity on bacteria and fungi. Aiming at evaluating the antifungal activity of citral on *Candida* sp yeasts, the present investigation analyzed 32 samples of *Candida albicans*, 25 of *C. tropicalis*, 20 of *C. parapsilosis* and 5 of *C. glabrata* isolated from hospitalized patients. Citral at concentrations of 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, and 60% (v/v) were assayed by agar diffusion technique on Sabouraud medium. The antifungal activity of citral was evidenced on all selected yeast at concentration of  $\geq 25\%$ . Hence, further studies on citral antimicrobial activity on other pathogenic fungi species could be performed, also on the citral toxicological and pharmacological properties in order to be used as an crucial active principle for manufacturing new antifungal agents.

**Key words.** citral, *Candida* sp, yeasts, fungi and hospital infection.

## INTRODUÇÃO

A partir da década de 1970, observou-se um aumento na incidência das infecções sistêmicas graves por fungos oportunistas<sup>1</sup>. Registros no SENTRY Antimicrobial Surveillance Program referentes a agentes isolados nos casos de infecção sanguínea nosocomial apresentam leveduras do gênero *Candida* ocupando a quarta posição<sup>2</sup>.

*Candida albicans* (*C. albicans*) é a espécie mais frequentemente isolada e a principal envolvida na etiologia das infecções invasivas e superficiais<sup>2,3,4</sup>. Entretanto, tem sido verificada uma crescente participação de espécies não-*albicans* nas infecções hospitalares em vários países<sup>2,5,6,7,8,9,10</sup>. No Brasil, um estudo realizado na Santa Casa Complexo Hospitalar, foi verificado que espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 51,6% dos episódios de candidemia da Instituição; *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, e outras espécies foram responsáveis por 25,8%, 13,3%, 3,3%, 1,7% e 7,5% dos casos, respectivamente<sup>11</sup>.

Estudos relacionados às infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* têm mostrado que aproximadamente metade dos indivíduos, internados em unidades hospitalares, acometidos por candidemia evoluem para óbito. Entre as espécies responsáveis pelo elevado índice de mortalidade destacam-se *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*<sup>3,12</sup>. Não obstante, espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos disponíveis, atualmente, têm sido encontradas em várias regiões do mundo<sup>2,4,10,13,14,15</sup>.

Desse modo, em consideração ao aumento das infecções hospitalares causadas por leveduras do gênero *Candida*, bem como a ocorrência de cepas resistentes aos atuais antifúngicos, muitos trabalhos vêm sendo realizados com produtos de diversas espécies vegetais, frente a vários micro-organismos como, fungos e bactérias<sup>16,17,18</sup>. Entre as plantas utilizadas destaca-se *Cymbopogon citratus*, conhecida popularmente como capim-limão, da qual o óleo essencial extraído tem sido ativo contra leveduras do gênero *Candida*<sup>16</sup>. Tal atividade, segundo Onawunmi<sup>19</sup>, deve-se ao citral (3,7-dimetil-2,6 octadienal), componente majoritário do óleo obtido de folhas frescas, constituído de, aproximadamente, 40% de geranial e 31% de neral<sup>20,21</sup>.

Dentre as propriedades biológicas do citral, destaca-se sua ação fungicida<sup>22,23</sup>. Souza et al.<sup>24</sup> determinaram o perfil de sensibilidade de fungos filamentosos, isolados de alimentos, a vários fitoconstituintes obtidos de distintos óleos essenciais. Dentre os fitoconstituintes utilizados, o

citral apresentou a melhor atividade antifúngica para a maioria das cepas avaliadas.

No entanto, a atividade fungicida do citral tem sido verificada principalmente em fungos filamentosos, sendo poucos os estudos realizados com leveduras. Desse modo, devido a escassez de estudos realizados com fungos leveduriformes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do citral, contra leveduras do gênero *Candida* obtidas de pacientes hospitalizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba.

O componente citral (sintético), denominado 3,7 dimetil – 2,6 – octadienal (mistura *cis* e *trans* à 95%), utilizado nos testes antifúngicos, foi obtido pela empresa ACROS®.

Para os testes microbiológicos foram estudadas amostras de leveduras do gênero *Candida* registradas e pertencentes à Universidade de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz e Hospital Universitário de Taubaté (HUT). Tais amostras foram isoladas de diversas localidades (cateter, sondas, secreções das vias aéreas e gástricas, pele e mucosas, líquido peritoneal e sangue) de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar.

Foram estudadas 32 cepas de *C. albicans*, 25 de *C. tropicalis*, 20 de *C. parapsilosis* e 5 de *C. glabrata*, bem como cepas padrões de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

O método utilizado nos ensaios microbiológicos foi difusão em ágar (Pourplate). Em placas de antibiograma estéreis, foi acrescentado 1 mL da suspensão do micro-organismo, preparada em solução fisiológica e padronizada a 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a 10<sup>6</sup> UFC/mL. Posteriormente, foram adicionados 70 mL de ágar Sabouraud Dextrose (Difco Laboratórios Ltda). Após a solidificação do meio, foram realizadas seis cavidades radiais e uma central de 6 mm de diâmetro.

Para a avaliação antifúngica, o citral foi diluído em óleo vegetal de amêndoa (LECLERC-LTDA). As concentrações preparadas foram: 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60% (v/v). O nitrato de miconazol (20 mg/mL) foi utilizado como controle positivo.

Nas cavidades radiais foram aplicadas 20 µL de cada uma das concentrações preparadas do citral, e na cavidade central o controle positivo nitrato de miconazol

(20 µL). As placas permaneceram à temperatura ambiente até a total pré-difusão. Em seguida, foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas medindo, em milímetros, o diâmetro dos halos de inibição formados. Consideraram sensíveis ao citral todas as cepas com formação de halos de inibição ausentes de colônias microssatélites no seu interior. O resultado final foi determinado pela média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição de cada concentração do citral e controle positivo, entre as cepas da mesma espécie, considerando a distribuição normal sendo o desvio padrão  $\sigma_{(n-1)}$ <sup>16,17</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes para avaliar a atividade antifúngica do componente citral contra as leveduras do gênero *Candida* encontram-se nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

De acordo com os testes, foi constatada atividade antifúngica do citral em 100% das leveduras selecionadas a partir das concentrações de 15% para *C. albicans* (Tabela 1) e *C. glabrata* (Tabela 4), com halos de inibição numa média de 12 e 9 mm de diâmetro, respectivamente; e 25% para *C. tropicalis* (Tabela 2) e *C. parapsilosis* (Tabela 3) com halos em média de 14 e 10 mm, respectivamente.

Na menor concentração avaliadas (10%), 76% das cepas de *C. albicans* e 20% das cepas de *C. tropicalis* foram sensíveis, formando halos de inibição entre 8 a 11 mm e 8 a 10 mm, (Tabelas 1 e 2, respectivamente). Contudo, para *C. parapsilosis* e *C. glabrata* não ocorreu a formação de halos nesta concentração (Tabelas 3 e 4, respectivamente). Em relação à maior concentração de citral utilizada (60%), as médias dos halos de inibição das cepas de cada espécie estudada ficaram abaixo da média do controle positivo (Figura 1).

Das espécies estudadas, verificaram-se expressivas variações, de acordo com o desvio padrão, no grau de sensibilidade em algumas cepas, exceto para as amostras de *C. glabrata* o qual os halos foram parecidos (Tabela 4).

A Figura 1 representa as médias dos diâmetros dos halos de inibição de cada espécie de *Candida*, nas distintas concentrações do citral e nitrato de miconazol.

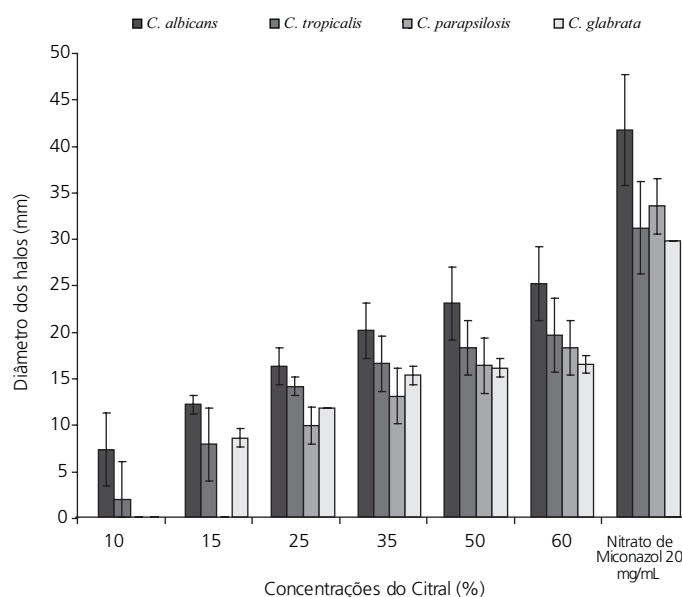
## DISCUSSÃO

Cada vez mais, têm sido realizadas pesquisas relacionadas a micro-organismos considerados de alta patogenicidade a sobrevida humana e resistência a antibióticos, associados

às infecções oportunistas, principalmente àqueles responsáveis por infecção hospitalar<sup>16</sup>. Assim, com o aumento considerável de infecções por leveduras do gênero *Candida*, em ambiente hospitalar e resistentes aos atuais antifúngicos<sup>3,10,12,13,14,15,25</sup> pesquisadores têm se dedicado a estudos de novos fármacos, sejam de origem natural ou sintética, com intuito de obter novos princípios ativos para uma possível aplicação clínica. Neste trabalho, verificou-se promissora atividade antifúngica do citral contra as leveduras de *Candida* obtidas de pacientes hospitalizados.

Com base nos resultados pôde-se observar que, de um modo geral, *C. albicans* foi a espécie mais sensível em relação às não-*albicans* frente ao citral (Figura 1). *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais sensível ao citral (Tabela 2). Esta espécie é considerada o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum nas infecções hospitalares no Brasil<sup>26,27</sup>, sendo responsável pelo alto índice de mortalidade em pacientes com candidemia<sup>3,12</sup>. Vale ressaltar que algumas cepas de *C. tropicalis* têm sido citadas como resistentes ao fluconazol<sup>28</sup>. *C. parapsilosis* foi a espécie de menor sensibilidade ao citral (Figura 1); nenhuma cepa desta espécie foi sensível nas concentrações abaixo de 25%, e o diâmetro dos halos foram relativamente menores que às demais espécies (Tabela 3).

*C. albicans* também mostrou maior sensibilidade ao nitrato de miconazol, do que as espécies não-*albicans*



**Figura 1.** Média dos halos de inibição (em mm) das amostras hospitalares de leveduras do gênero *Candida* sp frente ao citral (20 µL) em diferentes concentrações e ao controle positivo nitrato de miconazol (20 µL) a 20 mg/mL.

**Tabela 1.** Avaliação antifúngica do citral contra cepas de *C. albicans* isoladas de diferentes espécimes clínicas de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
003	11	14	18	24	33	34	52
008	0	10	14	15	17	18	28
011	11	14	20	27	30	30	49
012	10	12	17	23	30	32	48
013	9	11	17	25	27	29	47
014	9	13	20	23	27	27	47
015	10	14	18	25	26	26	47
020	11	13	16	18	20	22	40
023	9	14	20	23	24	26	52
024	9	14	18	24	27	34	43
030	0	11	14	17	19	21	31
031	9	11	16	19	22	24	47
034	0	11	13	15	19	19	44
035	8	10	15	16	17	20	40
055	9	11	16	17	19	21	51
056	11	13	20	22	24	26	47
060	11	12	17	21	30	34	37
061	9	11	16	20	24	26	40
064	0	10	15	18	24	26	40
065	9	11	14	19	24	29	34
069	0	12	15	19	21	22	36
070	0	12	16	22	22	23	35
072	10	13	16	18	21	25	35
073	10	12	15	19	20	22	40
074	0	12	16	22	23	23	40
078	9	13	17	20	20	21	40
085	9	11	16	18	20	22	50
086	0	15	17	24	26	28	40
087	8	10	16	20	23	26	43
091	10	14	15	18	20	24	40
094	10	12	15	19	24	28	43
104	10	13	16	20	22	25	37
ATCC 10231	11	14	16	19	21	25	45
Média em mm	7	12	16	20	23	25	42
Desvio padrão	± 4	± 1	± 2	± 3	± 4	± 4	± 6

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.  
Resultados numéricos em mm.

avaliadas (Figura 1). Sugerem-se estudos para verificar qual o mecanismo da ação antifúngica do citral sobre leveduras, uma vez que não existem trabalhos que relatem tal mecanismo. Porém, um estudo realizado com esporos de *Aspergillus flavus* demonstrou que o citral tem capacidade de: danificar diretamente a parede e a membrana celular dos esporos, causando a diminuição do volume celular;

aumentar a concentração e a agregação não funcional de macromoléculas levando à desordem metabólica; afetar o sistema de oxidação e o ciclo do ácido tricarboxílico sendo verificadas também mudanças na forma, no número e na diminuição da função das mitocôndrias; além de causar danos no DNA<sup>23</sup>. Já o mecanismo de ação dos azóis, outro antifúngico, consiste em interferir na biossíntese

**Tabela 2.** Análise da ação antifúngica do citral contra cepas de *C. tropicalis* isoladas de diferentes espécimes clínicas de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
005	0	12	15	17	18	19	34
006	10	12	16	26	30	30	34
009	10	11	15	19	25	27	43
033	0	8	13	17	19	20	35
037	8	13	16	17	18	20	33
041	0	0	15	16	16	16	29
045	0	10	15	16	17	17	25
047	0	9	15	18	19	20	30
048	0	0	14	16	17	18	25
050	0	10	15	17	18	19	29
051	0	9	13	15	16	16	24
054	0	0	13	15	16	16	24
057	0	9	14	15	17	20	35
058	10	11	14	18	22	25	35
062	0	0	17	20	23	25	38
066	0	10	15	16	17	18	30
067	0	10	15	17	20	21	30
071	0	9	15	16	17	20	31
081	9	9	13	16	18	21	40
082	0	8	12	14	15	16	29
083	0	10	13	15	16	17	28
095	0	8	15	18	19	20	35
097	0	10	14	15	16	19	32
101	0	9	13	16	17	19	36
103	0	0	10	12	14	15	22
Média em mm	2	8	14	17	18	20	31
Desvio padrão	± 4	± 4	± 1	± 3	± 3	± 4	± 5

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.  
Resultados numéricos em mm.



de ergosterol das células fúngicas, através da inibição da enzima 3A (CYP3A) do citocromo P-450, a lanosina 14-desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Em consequência, há alteração na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo. Os azóis atuam também sobre leveduras do gênero *Candida* impedindo a transformação das células leveduriformes em hifas, sua forma patogênica<sup>1</sup>.

Dentro das espécies estudadas, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, não houve uniformidade na formação dos halos de inibição, o que reflete diferenças de sensibilidade de cada cepa ao citral. Tal comportamento

pode ser justificado pela origem clínica destas amostras, pois as cepas foram obtidas de pacientes com diferentes graus de enfermidade, sítios de coleta e tratamentos com antifúngicos (Tabelas 1, 2 e 3).

Mesmo quando os halos de inibição formados pelas amostras de *Candida* não-*albicans* (Tabelas 2, 3 e 4) foram relativamente menores que aqueles formados pelas amostras de *C. albicans* (Tabela 1), não foi observada resistência ao citral em nenhuma das cepas selecionadas. Cabe ressaltar que a concentração mínima do citral para sensibilizar todas as leveduras do gênero *Candida* foi 25% (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

**Tabela 3.** Avaliação da ação antifúngica do citral contra cepas de *C. parapsilosis* isoladas de diferentes espécimes clínicos de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
002	0	0	9	10	12	15	32
004	0	0	10	12	14	17	34
007	0	0	8	10	14	18	35
010	0	0	8	10	12	14	30
022	0	0	10	13	16	20	35
026	0	0	14	16	25	26	38
038	0	0	8	12	15	18	34
042	0	0	13	15	19	20	38
044	0	0	9	10	20	20	34
049	0	0	11	15	20	20	37
052	0	0	9	10	15	15	34
053	0	0	8	9	13	14	34
059	0	0	9	15	16	20	33
080	0	0	13	14	19	20	36
089	0	0	8	15	15	16	35
090	0	0	10	15	15	16	30
093	0	0	8	12	14	20	37
099	0	0	12	17	19	20	30
100	0	0	9	15	16	19	30
102	0	0	10	14	17	18	34
ATCC	0	0	12	17	20	20	30
Média em mm	0	0	10	13	16	18	34
Desvio padrão	± 0	± 0	± 2	± 3	± 3	± 3	± 3

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.  
Resultados numéricos em mm.

**Tabela 4.** Resultado da ação antifúngica do citral contra cepas de *C. glabrata* isoladas de diferentes espécimes clínicas de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
016	0	8	12	16	17	17	30
032	0	9	12	16	16	16	30
036	0	8	11	14	15	17	30
039	0	9	12	16	17	17	30
040	0	9	12	15	16	16	30
Média em mm	0	9	12	15	16	17	30
Desvio padrão	± 0	± 1	± 0	± 1	± 1	± 1	± 0

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.  
Resultados numéricos em mm.

O citral tem mostrado ter alta eficiência sobre cepas de *C. albicans*, inclusive superando antifúngicos como a nistatina e cloreto de benzalcônio<sup>17,19,29,30</sup>. No entanto, no presente trabalho foi utilizado o nitrato de miconazol como controle positivo, numa concentração relativamente alta, que mostrou maior eficiência sobre as leveduras que o citral. Vale ressaltar que os trabalhos, citados acima, utilizaram poucas amostras sendo a maioria cepas padrões (ATCC). Nosso trabalho se difere pelo fato de se utilizar uma quantidade relativamente grande de isolados clínicos como amostras que, por sua vez, são conhecidas como resistentes aos antifúngicos convencionais<sup>2,4,10,13,14,15</sup>.

Mesmo com a escassez de dados relacionados à ação antifúngica do citral contra *Candida* sp., é possível comparar a diferença no grau de sensibilidade entre as cepas de uma mesma espécie, com a atividade antifúngica do óleo essencial obtido das folhas de *Cymbopogon citratus* (capim limão), já que o citral corresponde cerca de 70% dos constituintes do óleo<sup>20,21</sup>. Lima e Farias<sup>16</sup>, ao analisarem o referido óleo, verificaram variações no diâmetro dos halos de inibição em oito isolados clínicos de *C. albicans* (20 a 40 mm), em duas cepas de *C. tropicalis* (20 e 32 mm) e em duas cepas de *C. parapsilosis* (20 e 28 mm).

Segundo Onawunmi<sup>31</sup>, o citral possui uma melhor atividade em pH alcalino, e pode ser utilizado em combinação a outros agentes para aumentar sua atividade antimicrobiana. Em consequência da avaliação da atividade antifúngica do citral contra *Candida* sp., e da não ocorrência de cepas resistentes à este componente,

o presente trabalho abre perspectivas na produção de novos antifúngicos; já que estudos vem relatando o aumento de leveduras do gênero *Candida* resistentes aos antifúngicos convencionais disponíveis atualmente para uso clínico.

## CONCLUSÃO

O citral mostrou boa atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. Todas as cepas avaliadas foram sensíveis a partir da concentração de 25%. Sendo assim, sugere-se futuros estudos do citral frente a outras espécies de fungos patogênicos, como também ensaios toxicológicos e farmacológicos para que este componente possa ser utilizado, futuramente, como um importante princípio ativo na produção de novos antifúngicos.

## REFERÊNCIAS

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
2. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Clin Microbiol 2001; 39 (9): 3254-9.
3. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(4): 281-6.

4. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VL, Ruiz LRB, et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. An Bras Dermatol 2004; 79(6): 689-97.
5. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Souza A, Palacio A, et al. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5623-32.
6. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, D'enfert C, Fagon JY, CandiRea Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. Intensive Care Med 2008; 34(2): 292-9.
7. Horn DL, Fishman JA, Steinbach WJ, Anaissie EJ, Marr KA, Olyaei AJ, et al. Presentation of the PATH Alliance® registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(4): 407-14.
8. Jordà-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, et al. Risk factors for candidemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. Mycoses 2007; 50(4): 302-10.
9. Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De Rijdt T, Maertens J, Van Wijngaerden E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26(8): 541-7.
10. Odds FC, Hanson ME, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. J Med Microbiol 2007; 56: 1066-75.
11. Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'Azevedo A, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. Rev Inst Med Trop São Paulo 2004; 46(5): 239-41.
12. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clin Infect Dis 2003; 37: 634-43.
13. da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57(4): 399-404.
14. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2816-23.
15. Shen YZ, Qi TK, Ma JX, Jiang XY, Wang JR, Xu QN, et al. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. Mycoses 2007; 50: 475-80.
16. Lima EO, Farias NMP, et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. R Bras Ci Saúde 1999; 3(1/3): 51-64.
17. Schuck VJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. Rev Bras Ciên Farm 2001; 37(1): 45-9.
18. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J Ethnopharmacol 2002; 79: 213-20.
19. Onawunmi GO. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. Int J Crude Drug Res 1989; 27(2): 121-6.
20. Lewinsohn E, Dudai N, Tadmor Y, Katzir I, Ravid U, Putievsky E, et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae. Ann Bot (Lond) 1998; 81: 35-9.
21. Saleem M, Afza N, Anwar MA, Hai SM, Ali MS. A comparative study of essential oils of *Cymbopogon citratus* and some members of the genus *Citrus*. Nat Prod Res 2003; 17(5): 369-73.
22. Hayes AJ, Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. Food Chem Toxicol 2002; 40(4): 535-43.
23. Luo M, Jiang LK, Huang YX, Xiao M, Li B, Zou GL. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. Acta Biochim Biophys Sin 2004; 36(4): 277-83.
24. Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Braz Arch Biol Technol 2005; 48(2): 245-50.
25. Miranda ET, Silva RAM, Fusco-almeida AM, Melhem MSC, Pukinskas SR, Mendes-Giannini MJS. Epidemiologia de candidíase hospitalar: a importância da identificação específica. Rev Ciênc Farm 2003; 24(1): 39-45.
26. Oliveira RDR, Maffei CML, Martinez R Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. Rev Assoc Med Bras 2001; 47(3): 231-5.
27. Godoy P, Tiraboschi NI, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(3): 401-5.
28. Silva VV, Diaz MCJ, Febré N. Vigilancia de la resistencia de leveduras a antifúngicos. Rev Chil Infect 2002; 19 (Suppl 2): 149-56.
29. Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2008; 12(1): 63-6.
30. Abe S, Sato Y, Inoue S, Ishibashi H, Maruyama N, Takizawa T, et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. Jpn J Med Mycol 2003; 44(4): 285-91.
31. Onawunmi GO. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. Letters in applied microbiology 1989; 9: 105-8.

## Frequência de diagnóstico de lesões do colo uterino por faixa etária em mulheres atendidas no Programa de Rastreamento Viva Mulher no período de 2004 a 2008

Review on the occurrence of uterine cervix lesions according to age group among women enrolled in the Viva Mulher – Prevention Program during the period from 2004 to 2008

RIALA6/1199

Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO\*<sup>1</sup>, Sonia Maria Miranda PEREIRA<sup>1</sup>, Daniela ETLINGER<sup>1</sup>, Luciana Silva AGUIAR<sup>1</sup>, Yuriko Ito SAKAI<sup>1</sup>, Neuza Kasumi SHIRATA<sup>1</sup>, Mariete dos Santos TEIXEIRA<sup>1</sup>, Celso di LORETO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, Seção de Anatomia Patológica, Av. Dr. Arnaldo 355, 7º andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: lyamamot@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup>Seção de Anatomia Patológica, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 01.04.2009 – Aceito para publicação: 28.04.2009

### RESUMO

No presente estudo foi realizado o levantamento retrospectivo de diagnóstico citopatológico das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas pela método de Papanicolaou e sua distribuição por faixa etária das mulheres atendidas no período de 2003 a 2008. Das 222.024 amostras analisadas, 3.674 (1,65%) foram classificadas como insatisfatórias, 206.439 (92,98%) foram negativas e 11.911 (5,36%) apresentaram algum tipo de atipias nucleares. Dentre as alterações epiteliais atípicas, 6.437 (54,04%) foram de ASC-US e 210 (1,76%) de ASC-H; 3.264 (27,40%) de LSIL; 1.279 (10,74%) de HSIL; 131 (1,10%) de SCC; 552 (4,63%) por AGC-US e 23 (0,19%) de AGC-H; 7 (0,06%) de AIS e 8 (0,07%) de ADENOCA. Quanto à ocorrência e distribuição dos diagnósticos de lesões intraepiteliais escamosas e glandulares, de acordo com a faixa etária em intervalos de 5 anos, foi observada maior frequência de diagnóstico de LSIL entre as mulheres mais jovens (15-25 anos) e os diagnósticos de ASC-US, ASC-H, AGC-US, HSIL, SCC e ADENOCA nas mulheres >50 anos de idade. As alterações glandulares, como AGC-H e AIS, ocorreram em mulheres na faixa etária entre 30-34 e 45-49 anos. Foram detectados dois (0,16%) casos de HSIL em pacientes <14 anos e em 51 (3,99%) pacientes na faixa entre 15-19 anos. Os dados da presente avaliação enfatiza a importância de campanhas orientativas, rastreamento e seguimento das pacientes para garantir a melhoria e a efetividade dos programas de prevenção.

**Palavras-chave.** rastreamento citológico, esfregaço cervical, método de Papanicolaou, faixa etária.

### ABSTRACT

The retrospective study on cervico-vaginal smears analyzed by Papanicolaou (Pap) test at Instituto Adolfo Lutz – Division of Pathology, during the period from 2003 to 2008, was carried out. The diagnoses of pre-neoplastic and neoplastic lesions on Pap smears were analyzed, according to the age groups distribution. Of the 222,024 analysed samples, 3,674 (1.65%) were classified as unsatisfactory, 206,439 (92.98%) were negative and 11,911 (5.36%) presented abnormal cytology diagnoses. Of those with abnormal cytology, 6,437 (54.04%) were classified as ASC-US, 210 (1.76%) as ASC-H, 3,264 (27.40%) as LSIL, 1,279 (10.74%) as HSIL, 131 (1.10%) as SCC and 552 (4.63%) as AGC-US, 23 (0.19%) as AGC-H, 7 (0.06%) as AIS, and 8 (0.07%) were diagnosed as ADENOCA. The distribution of the squamous and glandular intraepithelial lesions diagnosis in the age group ranging at 5-year intervals, showed the major frequency of LSIL among younger women (15-25 years of age), and the diagnoses of ASC-US, ASC-H, AGC-US, HSIL, SCC and ADENOCA among >50 year- old women. The glandular variations as AGC-H and AIS occurred in women at of 30-34 and 45-49 age groups. Two (0.16%) women with HSIL were under 14 years of age, and 51 (3.99%) were from 15 to 19 years old. This study emphasizes the relevance in implementing the educational campaigns, the patients screening and follow-up protocols for assuring the improvement and the effectiveness of prevention programs.

**Key words.** cytology screening, cervical smears, Pap test, age group.

## INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres por ano e sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos comparado com os mais desenvolvidos<sup>1</sup>. Aproximadamente 80% dessas mortes ocorreram nos países em desenvolvimento<sup>2</sup>. Nos países desenvolvidos, onde os programas de rastreamento organizados foram implantados, a incidência de câncer cervical tem diminuído. Entretanto nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos que não têm acesso a programas de rastreamento efetivos, o câncer cervical ainda é um dos maiores problema de saúde<sup>2,3</sup>. Desde 1998, o Ministério da Saúde segue recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que propõe um exame citológico cervical (Papanicolaou) a cada três anos em mulheres de 25 a 59 anos de idade<sup>4</sup>.

O rastreamento populacional abrangente e constante pelo exame de Papanicolaou está associado a uma redução da mortalidade em mais de 70% em relação às populações fora da cobertura<sup>5</sup>. Provavelmente este efeito se deve ao grande número de mulheres nas quais foi detectada doença em estádios mais precoces, em que as chances de cura são maiores, como: lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL), atípicas escamosas ou glandulares de significado indeterminado nas quais não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H e ASG-H, respectivamente) ou adenocarcinoma *in situ* (AIS)<sup>6</sup>.

O exame de Papanicolaou tem sido a principal ferramenta na prevenção de câncer cervical há mais de cinquenta anos, o que proporcionou quedas expressivas na incidência e mortalidade por esta doença em muitos países<sup>7</sup>. Essa tendência foi atribuída aos programas de rastreamento por este método difundido em muitos países. A acurácia deste exame em detectar anormalidades citológicas tem sido bastante questionada por apresentar sensibilidade bastante variável (30% a 87%) e especificidade entre 86% e 100%<sup>8</sup>, pelo método convencional. A real sensibilidade é de aproximadamente 60% em programas de rastreamento rotineiro<sup>9</sup>.

Para melhorar o desempenho dos exames citopatológicos é necessário implementar programas de controle de qualidade interno (CQI) e externo na rotina diagnóstica, com o objetivo de reduzir resultados falso-negativos<sup>10,11</sup>. O CQI deve compor um conjunto de ações

sistematizadas e realizadas regularmente, que abrange o monitoramento da adequabilidade da amostra, revisão hierárquica dos esfregaços e revisão dos casos negativos. A revisão dos esfregaços pela metodologia do roteiro de critérios de risco (RCR) avalia as informações clínicas relevantes, antecedentes e sintomas que podem ser associados aos riscos para lesões cervicais<sup>12,13</sup>. A técnica de revisão dos esfregaços prévios negativos é o método CQ recomendado pela Academia Internacional de Citologia<sup>14</sup> e, no Brasil, o Monitoramento Externo de Qualidade (MEQ) foi elaborado a partir de recomendações do Instituto Nacional do Câncer (INCA), com intuito de oferecer aos laboratórios da Rede Pública uma avaliação de desempenho nos diagnósticos citológicos do colo uterino e fornecer fomentos para educação continuada<sup>15</sup>.

O Programa de Prevenção do câncer de colo uterino tem sido uma estratégia bastante eficaz para o rastreamento do câncer cervical. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição dos diagnósticos citopatológicos das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino, por faixa etária, pertencentes à rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado levantamento retrospectivo dos diagnósticos pelo método de Papanicolaou em esfregaços cérvicovaginais, provenientes de mulheres que realizaram exames pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no período de novembro de 2003 a outubro de 2008 avaliados pelo Setor de Citologia Oncótica da Divisão de Patologia, no Instituto Adolfo Lutz. As amostras foram coletadas com espátula de Ayre e/ou *citobrush*, fixadas em polietilenoglicol (Carbowax), nas Unidades de Saúde, e coradas pelo Método de Papanicolaou em nosso laboratório. A classificação utilizada para o diagnóstico dos exames de Papanicolaou no período de 2004 a 2006, foi de acordo com o *Bethesda System*, 2001. A partir de 2007, por recomendação do Instituto INCA, passou-se a utilizar a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e condutas preconizadas<sup>16</sup>. Com a nova nomenclatura, foram incluídas as subdivisões das atípicas escamosas/glandulares de significado indeterminado (ASC-US; AGC-US), não se podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H/AGC-H) respectivamente.

Neste período de cinco anos, 222.024 amostras cérvicovaginais foram submetidas à avaliação pré-analítica sobre a adequabilidade da amostra para análise segundo



critérios recomendados pelo Ministério da Saúde (MS)<sup>12</sup> e pelos critérios estabelecidos no laboratório. A avaliação analítica inclui os diagnósticos descritivos como: dentro dos limites da normalidade/ alterações celulares benignas reativas ou reparativas; ou classificadas como atípicas em diferentes graus. Em todos os casos foi avaliada também a microbiologia.

Para garantia da qualidade dos diagnósticos citopatológicos, o Setor de Citologia Oncótica realiza revisão das amostras como rotina, há mais de 15 anos pelo CQI através da metodologia RCR com considerações clínicas relevantes e citológicas, segundo recomendação do INCA<sup>12</sup> e revisão de 10% (R10%) dos diagnósticos negativos selecionados aleatoriamente<sup>14,15</sup>. Pela metodologia do RCR, foram selecionadas amostras com base nas considerações clínicas da requisição de solicitação do exame: amostras consideradas inadequadas para análise; amostras com diagnósticos suspeitos entre outras. Também foram realizadas revisões de esfregaços cervicais prévios negativos em mulheres com diagnóstico de ASC-H, HSIL, SCC, AGC-H, AIS, ADENOCA e SCC<sup>14</sup>. Os diagnósticos provenientes de mulheres com idade <14 anos a >50 anos e inclusive as sem idade (s/idade) do período de 2004 a 2006, foram compilados por faixa etária em intervalos de cinco anos, analisados conforme a distribuição e comparados ano/ano.

## RESULTADOS

No total de 222.024 amostras analisadas no período de novembro de 2003 a outubro de 2008, a classificação das amostras foi: 3.674 (1,65%) insatisfatórias, com variação de 0,59% (2005) a 2,82% (2008); 206.439 (92,38%) negativas, com variação de 89,23% (2008) a 94,42% (2005) e 11.911 (5,37%) com algum grau de atipia nuclear (Tabela 1). Dentre os 11.911 casos com alterações epiteliais atípicas, 6.647 (54,04%) apresentaram atipias escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASC-US) e 210 (1,76%) mostraram atipias escamosas de significado indeterminado, nas quais não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H); 3.264 (27,40%) lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), 1.279 (10,74%) lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); 131 (1,10%) carcinoma de células escamosas (SCC); 552 (4,63%) atipias glandulares de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas ou (AGC-US), 23 (0,19%) atipias glandulares de significado indeterminado, nas quais não se pode afastar lesão de alto grau (AGC-H),

7 (0,06%) adenocarcinoma in situ (AIS) e 8 (0,07%) adenocarcinoma (ADENOCA) (Tabela 2).

A distribuição dos diagnósticos das lesões intraepiteliais escamosas e glandulares, por faixa etária com intervalos de 5 anos, apresentou maior frequência entre LSIL nas mulheres mais jovens (17,25%, 22,79% e 16,91%) no intervalo entre 15-29 anos de idade respectivamente e os casos de ASC-US, ASC-H, HSIL, SCC, AGC-US e ADENOCA nas mulheres > 50 anos. Já as alterações glandulares como AGC-H e AIS foram detectadas em mulheres na faixa etária entre 30-34 e 45-49 anos. Foram detectados 2 (0,16%) casos de HSIL em pacientes <14 anos e 51 (3,99%) casos na faixa etária entre 15-19 anos.

O CQI revisou neste período de cinco anos 21% das amostras citopatológicas, sendo que 9% foi pela técnica de R10% e 12% pelo RCR.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nos países em desenvolvimento o câncer cervical ainda é um problema de saúde pública. Provavelmente isso se deve a limitações de recursos ou programas de rastreamentos deficientes, tornando difícil a identificação do grupo etário alvo para cobertura desses programas<sup>17</sup>. No Brasil, após a implantação do Programa "Viva Mulher" em 1998, o INCA exerce um importante papel na elaboração de normas e rotinas, bem como gera planejamento estratégico para o programa<sup>18</sup>.

Apesar das controvérsias nos últimos anos, sobre a sensibilidade e especificidade do método de Papanicolaou em programas de rastreamento<sup>8</sup>, este ainda tem demonstrado ser eficaz na prevenção do câncer de colo uterino. Para garantir a eficácia dos resultados dos exames citopatológicos, foi realizada a rejeição da amostra na fase pré-analítica segundo critérios recomendados pelo MS<sup>12</sup>; utilizamos também critérios estabelecidos pelo Setor de Citologia Oncótica<sup>19</sup>, implementados a partir do programa de controle de qualidade interno e externo, bem como a capacitação e treinamento de novas metodologias<sup>20</sup>. O CQI realizado pela metodologia do RCR é considerado mais sensível do que a revisão aleatória de 10% na otimização em detectar lesões precoce do câncer do colo do útero<sup>10,13</sup>.

No período analisado, amostras insatisfatórias foram detectadas em 1,65% dos casos. Em estudo anterior, os autores relatam 2,54% de amostras insatisfatórias no período de 2005 a 2007, nas quais as principais causas foram:

**Tabela 1.** Distribuição dos 222.024 diagnósticos citopatológicos cervicovaginais realizados no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz - SP, no período de nov. 2003 a out. 2008

	2004		2005		2006		2007		2008		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Insatisfatório	724	1,129	352	0,592	1120	2,653	765	2,478	713	2,817	3674	1,655
Negativo	60254	93,949	56178	94,425	39168	92,782	28254	91,529	22585	89,234	206439	92,980
ASC-US	1505	2,347	1668	2,804	1086	2,573	973	3,152	1205	4,761	6437	2,899
ASC-H	0	0	0	0	0	0	72	0,233	138	0,545	210	0,095
LSIL	912	1,422	853	1,434	588	1,393	510	1,652	401	1,584	3264	1,470
HSIL	529	0,825	286	0,481	157	0,372	157	0,509	150	0,593	1279	0,576
SCC	65	0,101	32	0,054	14	0,033	9	0,029	11	0,043	131	0,059
AGC-US	141	0,220	121	0,203	79	0,187	114	0,369	97	0,383	552	0,249
AGC-H	0	0	0	0	0	0	14	0,045	9	0,036	23	0,010
AIS	2	0,003	2	0,003	1	0,002	1	0,003	1	0,004	7	0,003
ADENOCA	3	0,005	3	0,005	2	0,005	0	0	0	0	8	0,004
<b>Total</b>	<b>64135</b>	<b>100</b>	<b>59495</b>	<b>100</b>	<b>42215</b>	<b>100</b>	<b>30869</b>	<b>100</b>	<b>25310</b>	<b>100</b>	<b>222024</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Distribuição dos 11.911 diagnósticos citopatológicos cervicais com alterações atípicas, realizados no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz - SP, por faixa etária de intervalos de cinco anos

	ASC-US		ASC-H		LSIL		HSIL		SCC		AGC-US		AGC-H		AIS		ADENOCA				
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%			
< 14	23	0,36	0	0	26	0,80	2	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
15-19	523	8,12	8	3,81	563	17,25	51	3,99	0	0	15	2,72	1	4,35	0	0	0	0	0		
20-24	916	14,23	21	10,00	744	22,79	123	9,62	0	0	24	4,35	2	8,70	0	0	0	0	0		
25-29	878	13,64	27	12,86	552	16,91	193	15,09	5	3,82	47	8,51	2	8,70	0	0	0	0	0		
30-34	691	10,73	22	10,48	416	12,75	214	16,73	7	5,34	70	12,68	5	21,74	2	28,57	0	0	0		
35-39	680	10,56	23	10,95	316	9,68	179	14,00	16	12,21	79	14,31	2	8,70	1	14,29	0	0	0		
40-44	631	9,80	22	10,48	233	7,14	178	13,92	19	14,50	87	15,76	2	8,70	1	14,29	0	0	0		
45-49	570	8,86	13	6,19	180	5,51	88	6,88	15	11,45	81	14,67	6	26,09	2	28,57	0	0	0		
> 50	1505	23,38	74	35,24	222	6,80	243	19,00	67	51,15	146	26,45	3	13,04	1	14,29	7	87,50	7	87,50	
s/ idade	20	0,31	0	0	12	0,37	8	0,63	2	1,53	3	0,54	0	0	0	0	0	1	12,50	1	12,50
<b>Total</b>	<b>6437</b>	<b>100</b>	<b>210</b>	<b>100</b>	<b>3264</b>	<b>100</b>	<b>1279</b>	<b>100</b>	<b>131</b>	<b>100</b>	<b>552</b>	<b>100</b>	<b>23</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	

artefato de dessecamento, presença de piócitos, material insuficiente, presença de sangue e superposição celular<sup>19</sup>.

Neste estudo, observou-se que a frequência de LSIL foi maior na faixa etária entre 20 a 24 anos (22,79%), que corrobora os dados da literatura em que as lesões de baixo grau se concentram nas faixas etárias entre 15 a 29 anos, com aumento significativo na faixa de 20 a 24 anos, não priorizada pelo Programa<sup>21,22,23</sup>. A classificação ASC-H foi introduzida pelo Sistema de Informação do câncer do colo do útero (SISCOLO) a partir de 2006 e compilados a partir de 2007<sup>18</sup>; nestes dois anos foram detectadas estas alterações em 0,09% dos casos; estudos anteriores relatam taxa de 0,3% de ASC-H<sup>22,24</sup>. Barret et al.<sup>24</sup> observaram que em 72% das pacientes com diagnóstico de ASC-H, apresentaram correlação cito-histológica de HSIL confirmando assim, a associação desta categoria diagnóstica com o risco para câncer cervical.

Alguns autores relatam que a taxa de exames com anormalidades é menor nas mulheres com maior idade<sup>25,26</sup>. Em nosso estudo, os diagnósticos mais frequentes nas mulheres acima de 50 anos foram de ASC-US/H, AGC-US, HSIL, SCC e ADENOCA. Estes achados enfatizam a importância da realização do exame de Papanicolaou periódico em mulheres na perimenopausa, devido à proporção significativa de lesões precursoras desenvolvidas neste grupo de idade<sup>6,17</sup>.

O conjunto dos achados diagnósticos através de lesões em fases iniciais, consideradas precursoras do câncer do colo de útero, desempenha importante papel no processo de evolução da doença<sup>17</sup>. Resultados indicam que tais lesões estão se apresentando mais frequentemente em mulheres mais jovens (25 anos)<sup>23,27</sup>. Em nossa casuística são relatados dois casos de HSIL em pacientes <14 (0,16%) e 51 (3,99%) na faixa etária entre 15-19 anos. Em estudo anterior Yamamoto et al.<sup>21</sup> relataram 0,25% e 3,62% respectivamente nestas mesmas faixas etárias. Os resultados do presente estudo mostram que a frequência dos diagnósticos atípicos vem aumentando progressivamente ao longo dos últimos anos, e em maior proporção na população mais jovem; as lesões escamosas de alto grau (ASC-H, HSIL, SCC) são mais frequentes nas mulheres > 50 anos. Já as lesões glandulares de alto grau (AGC-H e AIS) aparecem predominantemente nas mulheres da faixa etária entre 30-34 anos (Tabela 2). Os dados apontam que a realização periódica do exame de Papanicolaou ainda é o melhor meio para a detecção de lesões pré-neoplásicas, mesmo com as limitações de cobertura populacional de rastreamento<sup>20,21,22,23</sup>. Por outro lado, estudiosos de países

desenvolvidos tecem críticas severas quanto à sensibilidade limitada do método citológico<sup>17</sup>.

Alguns tipos de Papilomavirus humano (HPV), nos últimos anos, têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de neoplasias nas regiões que comumente infectam, compreendendo na mulher, principalmente a região genital. Estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular demonstram presença do DNA-HPV (tipos 16 e 18) em mais de 99,7% dos casos de câncer cervical e atualmente já está bem estabelecido que a infecção pelo HPV é o fator central e causal do câncer do colo do útero<sup>28</sup>. A transmissão do HPV ocorre através do contato sexual, sendo assim, é de extrema importância educar a população quanto ao modo de transmissão. Para isso é necessário enfatizar os métodos preventivos, bem como os comportamentos de risco. A educação visa tanto a prevenção quanto à detecção precoce da doença<sup>28,29</sup>.

Concluimos que o método de Papanicolaou é importante ferramenta para a detecção do câncer de colo uterino, principalmente quando realizado sob rigoroso controle de qualidade interno e externo. Nossos dados reforçam a necessidade de campanhas orientativas, *follow-up* das pacientes e planejamento de futuras ações para a melhoria e efetividade dos programas de prevenção das doenças sexualmente transmissíveis.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade do câncer no Brasil. 2008, Rio de Janeiro [acesso em 24/04/09]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2008/>
2. Ferlay JFB, Pisaniand P, Parkin DM. GLOBOCON 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase N° 5, Version 2.0 Lyon: IARC Press, 2004.
3. WHO. Control of cancer of cervix uteri. A WHO meeting. Bull WHO 1986; 64: 761-9.
4. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Consenso de periodicidade e faixa etária no exame de prevenção do câncer cérvico-uterino, 1988. Rev Bras Cancerol. 1989; 35(1/2):77.
5. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. Lancet. 2004; 364(9430): 249-58.
6. Calazan C, Luis RR, Ferreira I. O diagnóstico do cancer do colo uterino invasor em um Centro de Referência Brasileiro: Tendência temporal e potenciais fatores relacionados. Rev Bras Cancerol. 2008; 54(4): 325-31.

7. Hankey BF, Ries LA, Edwards BK. The surveillance, epidemiology, and end results program. A National Resource. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.* 1999; 8: 1117-21.
8. Nanda K, Mccrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities. *Ann Intern Med.* 2000, 132(10): 810-9.
9. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol.* 1995; 141: 680-9.
10. Renshaw AA. Accurate and precise methodologies for routine determination of false-negative rate of Papanicolaou smear screening. *Cancer Cytopathol.* 2001; 93: 86-92.
11. Ferraz MGMC, Agnol MD, di Loreto C, Pirani WM, Utgawa ML, Pereira SMM, Sakai YI, Feres CL, Shih LWS, Yamamoto LSU, Rodrigues ROL, Shirata NK, Longatto-Filho A. 100% rapid rescreening for quality assurance in a quality control program in a public health cytology laboratory. *Acta Cytol.* 2005; 49(6): 639-43.
12. Ministério da Saúde. Prevenção do câncer do colo do útero. Manual Técnico para Laboratórios. Brasília (DF); 2002.
13. Tavares SBN, Amaral RG, Manrique EJC, Sousa NLA, Albuquerque ZBP, Zeferino LC. Controle de qualidade em citopatologia cervical: revisão de literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2007; 53(3): 355-64.
14. CLIA 88: Centers for Disease Control: regulations for implementing clinical laboratory improvement of 1988: A summary. *J Am Med Assoc.* 1992; 267: 1725-34.
15. Pereira SMM, Ramos DEL, Yamamoto LSU, Shirata NK, di Loreto C, Ferraz MGMC, Longatto-Filho A e grupo de cols. Monitoramento externo de qualidade em citopatologia cervical e o reflexo na rotina dos laboratórios da rede pública. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 2006; 18(3): 172-7.
16. Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(5): 351-73.
17. Gupta S, Sodhani P, Halder K, Chachra KL, Singh V, Sehgal A. Age trends in pre-cancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in a cytology screening program: what should be the target age group for a major thrust of screening in resource-limited settings. *Cytopathol* 2008; 19: 106-10.
18. Instituto Nacional de Câncer. Implantando o Viva Mulher – Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama. Rio de Janeiro (Brasil): Instituto Nacional de Cancer; 2001.
19. Ducatti C, Ramos DEL, Gomes LP, Aguiar LS. Não-conformidades em exames citopatológicos: um problema no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino. *J Bras Patol Med Lab.* 2008; 44(2): 116.
20. Pereira SMM, Yamamoto LSU, di Loreto C, Silva LA, Makabe S, Marques JA, Maeda MYS, Santoro CL, Utgawa ML, Longatto-Filho A. O impacto do diagnóstico citológico de atipias indeterminadas no Sistema Público de Saúde. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 2005; 17(4): 251-4.
21. Yamamoto LSU, Saito S, Pereira SMM, Utgawa ML, Longatto-Filho A. Uterine Cytopathology in a public health laboratory: impact from 20 years data (1984-2003). *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2006; 65(2): 141-5.
22. Etlinger DLR, Pereira, SMM, Oikawa KF, Marin AC, Araujo RS, Souza CJ, Yamamoto LSU. Campanha de prevenção de câncer cervical: estudos no Instituto Adolfo Lutz mostram a necessidade de avaliação na faixa etária. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2008; 67(1): 64-8.
23. Cabral MDB, Feitosa TMP, Figueiredo RM, Almeida RT. Análise do rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Rio de Janeiro. 2008. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.
24. Barret D, Schepansky A, Capstick V, Johnson G, Steed H, Faught W. Atypical squamous cells-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H): A result not to be ignored. *Gynecol.* 2006; 1095-8.
25. Rader AE, Rose PG, Rodriguez M, Mansbacher S, Pitlik D, Abdul-Karim FW. Atypical squamous cells of undetermined significance in women over 55. Comparison with the general population and implications for management. *Acta Cytol* 1999; 43(3): 357-62.
26. Kaminski PF, Stevens CWJ, Wheelock JB. Squamous atypia on cytology. The influence of age. *J Reprod Med.* 1989; 34: 617-20.
27. Longatto-Filho A, Etlinger D, Gomes NS, Cruz SV, Cavalieri MJ. Frequencia de esfregaços cérvico-vaginais anormais em adolescentes e adultas: revisão de 308.630 casos. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2003; 62(1): 31-4.
28. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; 14: 40470.
29. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J.* 2001; 164(7): 1017-25.



# Estudo retrospectivo dos diagnósticos cito-histopatológicos nas atipias de significado indeterminado

## Retrospective study on cyto-histological diagnoses in the atypical squamous cells of undetermined significance

RIALA6/1200

Neuza Kasumi SHIRATA<sup>1\*</sup>, Carla DUCATTI<sup>1</sup>, Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO<sup>1</sup>, Sonia Maria Miranda PEREIRA<sup>1</sup>, Daniela ETLINGER<sup>1</sup>, Luciana Silva AGUIAR<sup>1</sup>, Yuriko Ito SAKAI<sup>1</sup>, Celso di LORETO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Seção de Anatomia Patológica, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 7º andar, CEP 012246-902, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: shirata86@hotmail.com

<sup>1</sup>Seção de Anatomia Patológica, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 01.04.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

No presente estudo foi avaliada a história de realização dos exames citológicos (EC) prévios e posteriores com diagnóstico citológico de células escamosas atípicas (ASC) e sua correlação com os resultados de exames de biópsias. Para tanto, foi realizado o estudo retrospectivo, de 60 casos de EC cérvico-vaginais com diagnóstico de ASC e biópsias correlatas, os exames prévios e posteriores de ASC e a periodicidade de exames realizados. Das 60 análises selecionadas, 57 apresentaram diagnóstico citológico anterior de ASC-US (possivelmente não neoplásico), 30 (52,6%) foram negativos no exame de biópsia, 16 (28,1%) de NIC 1, 11 (19,3%) com diagnósticos discrepantes acima de 2 graus; 3 (100%) casos de ASC-H (não se pode afastar lesão de alto grau) foram NIC 1 na biópsia. Dentre os 60 casos, 44 (73,3%) que tiveram exames anteriores, 14 (23,3%) eram positivos; 53 (88,3%) que fizeram EC posteriores à biópsia, 10 (16,7%) eram positivos. Quanto à periodicidade dos exames, 26 (43,3%) realizaram o exame com intervalo de até 1 ano, 29 (48,3%) de 1 a 3 anos, 1 (1,7%) em intervalo maior que 3 anos. De acordo com os achados observados neste estudo, os diagnósticos citológicos de ASC, quando comparado com os exames da biópsia, estavam mais frequentemente associados às alterações morfológicas reacionais. Estes dados mostram o valioso papel da correlação cito-histológica, uma vez que a execução apenas do seguimento citológico pode ser insuficiente para obter o diagnóstico morfológico. É salientada, ainda, a necessidade de efetuar o exame de acompanhamento de seis em seis meses, para realizar o controle evolutivo dessas atipias, bem como para auxiliar na conduta terapêutica das pacientes.

**Palavras-chave.** ASC, diagnóstico citológico, exame de Papanicolaou, neoplasia intraepitelial cervical, correlação cito-histológica

### ABSTRACT

The history of the previous and the later Papanicolaou smears results with diagnosis of atypical squamous cells (ASC) and its correlation with respective biopsies was retrospectively analyzed. The previous and the later exams which resulted as diagnoses of ASC by cytologic test were investigated, and also the examinations periodicity. Of 60 selected cases of ASC with correlated biopsy results, 57 had the first cytologic diagnosis of ASC-US (undetermined significance) and 3 had ASC-H (cannot exclude high grade lesion) diagnosis. Of 57 cases, 30 (52.6%) were negative on biopsy, 16 (28.1%) had a diagnosis of NIC 1, and 11 (19.3%) presented diagnose discrepancies above 2 degrees. Among ASC-H (100%) all the cases were diagnosed as NIC 1 on biopsy. Of 60 cases, 44 (73.3%) cases who had previous examinations results, 14 (23.3%) were positive. Among patients who had the later cytology exams, 53 (88.3%) had cytologic examinations after being biopsied, and 10 (16.7%) were positive. Concerning the examinations periodicity, 26 (43.3%) were examined 1- year interval, 29 (48.3%) at 1 to 3-year interval, and one (1.7%) at a period longer than three years. According to the observed findings the ASC diagnoses were frequently associated with reactional morphologic changes, showing the relevance in carrying out the cyto-histological correlation, since performing cytological follow up only it should be insufficient for adequately managing the patients. It is emphasized the importance in conducting ASC patients follow up every 6 months for assessing the evolutionary control of these atypias and for guiding the introduction of an adequate treatment protocol.

**Key words.** ASC, cytologic diagnoses, Pap test, cervical intraepithelial neoplasia, cyto-histological correlation

## INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é uma neoplasia com alta prevalência e incidência, apresentando um dos mais altos potenciais de prevenção e cura, quando diagnosticado e tratado precocemente. Sua incidência é maior em países menos desenvolvidos, quando comparado aos mais desenvolvidos, sendo evidente na faixa etária de 20 a 29 anos, e o risco aumenta na faixa etária de 45 a 49 anos<sup>1,2,3</sup>.

O câncer de colo uterino é o terceiro câncer mais comum no mundo, estimando-se a detecção de mais de 471.000 casos novos anuais. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, estimou-se 18.680 novos casos de câncer de colo do útero em 2008, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres<sup>1</sup>.

A relação entre o câncer cervical e a infecção por Papilomavírus humano (HPV) já está bem estabelecida. Sabe-se hoje que para o surgimento do câncer do colo de útero, é necessária a presença da infecção por um dos 15 tipos existentes de HPV de alto risco, sendo os tipos 16 e 18 os mais prevalentes. O DNA do HPV de alto risco é detectado na maioria dos espécimes (92,9% a 99,7%) de câncer cervical invasivo<sup>4,5,6</sup>.

O exame citopatológico convencional (Papanicolaou) foi introduzido no Brasil na década de 1950, sendo a principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados ao controle do câncer do colo do útero. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estudos demonstram que, em mulheres entre 35 e 64 anos, depois de um exame citopatológico negativo, o exame subsequente pode ser realizado a cada três anos, com a mesma eficácia da realização anual. No Brasil, o INCA, em 1998, definiu que o exame citológico deverá ser realizado em mulheres de 25 a 60 anos, ou mesmo antes dessa faixa etária, nas mulheres com vida sexual ativa, uma vez por ano e, após dois exames anuais consecutivos negativos, a cada três anos. Para as mulheres que compreendem outra faixa etária, é feito o agendamento do exame quando indicado<sup>5,6</sup>.

Apesar do sucesso na prevenção do câncer cervical nos países onde há eficientes programas de rastreamento, um dos maiores problemas que os laboratórios de citopatologia enfrentam em sua rotina são as altas taxas de resultados falso-negativos. Estudos têm demonstrado que resultados falso-negativos variam de 6% a 56% e as principais causas de erros estão relacionadas à coleta, erros de escrutínio e de interpretação dos diagnósticos. O câncer cervical ocorre com maior frequência em mulheres que

nunca fizeram o rastreamento, mas, um estudo realizado no Reino Unido detectou que 47% dos casos de câncer cervical invasivo ocorreram em mulheres que apresentaram resultados negativos em citologias recentes e com uma história de *screening* aparentemente adequada<sup>7,8</sup>.

Em 2005, segundo o INCA, apenas seis estados brasileiros e o Distrito Federal apresentaram 100% dos seus municípios com taxas de exames insatisfatórios menores que 5%, padrão mínimo de qualidade estabelecido pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Outro indicador é o índice de atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASC), que vem crescendo nos últimos anos, chegando, em 2005, a 46,9% dos exames positivos<sup>9,10</sup>.

O ASC encontra-se nos novos termos criados pelo Sistema Bethesda para melhoria de comunicação entre o serviço de citopatologia e o clínico. São definidas como alterações morfológicas mais marcantes que as esperadas para alterações reativas, mas que quantitativamente e qualitativamente não são suficientes para o diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa<sup>6,11,12</sup>.

O diagnóstico de ASC é de difícil interpretação, e na histologia é traduzida em várias possibilidades, desde o achado de normalidade até carcinoma escamoso invasor, não havendo, portanto, uma correlação direta entre o diagnóstico citológico e uma lesão histológica. Sua correlação com lesões histológicas graves é muito baixa: cerca de 5% a 15% das mulheres com ASC apresentam neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3), e cerca de 0,1% pode estar associado à presença de uma neoplasia. É importante salientar que 20 a 40% das pacientes com diagnóstico de ASC terão NIC associado<sup>11,12,13,14, 15</sup>.

Devido a subjetividade envolvida na interpretação das ASC, o seguimento das pacientes e a correlação cito-histológica é de suma importância para a garantia de qualidade dos exames citopatológicos<sup>13,16</sup>. O exame histológico, realizado em biópsia cervical obtida na colposcopia, é aceito como o “padrão-ouro” para o diagnóstico do câncer cervical<sup>7,17,18</sup>.

Novos métodos de rastreamento, como testes biomoleculares para detecção do DNA do HPV e exames citológicos em meio líquido são apontados, em vários estudos, como eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero, mas no Brasil, ainda é preconizado como teste primário a citologia convencional<sup>7,14,19,20,21</sup>.

O presente estudo teve como objetivo analisar a história de realização de exames citológicos prévios

e posteriores com diagnóstico citológico de ASC e sua correlação com as biópsias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados retrospectivamente 60 casos de exames citopatológicos cérvico-vaginais provenientes do SUS (Sistema Único de Saúde), com diagnóstico citopatológico de ASC (ASC-US e ASC-H), no período de 2002 e 2008, pertencentes ao Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz (SCO-IAL).

As amostras cérvico-vaginais foram coradas pelo método de Papanicolaou e classificadas segundo nomenclatura do Sistema de Bethesda. A partir de 2007, por recomendação do Instituto INCA passou-se a utilizar a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e condutas preconizadas<sup>22</sup>. Todos os 60 casos apresentavam biópsias correlatas. Os cortes histopatológicos foram corados pelo método de Hematoxilina & Eosina e classificados de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde<sup>23</sup>.

Os casos foram selecionados do banco de dados do Sistema de Informação do Controle de Câncer de Colo Uterino – Ministério da Saúde (SISCOLO).

Foram coletados do SISCOLO informações como a idade das pacientes, periodicidade da realização de exames, resultados histopatológicos, bem como os resultados citológicos anteriores e posteriores ao diagnóstico citológico de ASC e biópsia.

Para este estudo, os diagnósticos histopatológicos foram utilizados como padrão-ouro.

## RESULTADOS

A média de idade das pacientes pertencentes a este estudo foi de 33 anos, variando de 18 a 73 anos.

A Tabela 1 demonstra a correlação cito-histológica dos casos de ASC. Dos 60 casos selecionados com biópsia correlata, 57 tiveram diagnóstico citológico de ASC-US e 3 de ASC-H. Foram observados que dos 57 casos de ASC-US, 30 (52,6%) foram negativos na biópsia, 16 (28,1%) tiveram diagnóstico de NIC 1 e 11 (19,3%) tiveram diagnósticos discrepantes acima de 2 graus. Nos casos de ASC-H, todos os 3 (100%) casos foram diagnosticados como NIC 1 na biópsia.

A Tabela 2 demonstra os exames citológicos anteriores ao diagnóstico citológico de ASC. Dos 60 casos, 44 (73,3%) tinham exames anteriores no SCO-IAL, e em 16 (28,1%) não foi encontrada nenhuma informação. Destes 57 ASC-US, 29 (50,9%) tinham citologia anterior negativos, 7 (12,3%) foram ASC, 1 (1,7%) ASC-H, 3 (5,3%) LSIL, 1 (1,7%) HSIL e em 16 (28,1%) não foi encontrada nenhuma informação. Nos 3 casos de ASC-H, 1 (33,3%) foi negativo e 2 (66,7%) ASC-US.

Na Tabela 3, dos 60 casos, 53 (88,3%) tinham exames citológicos posteriores à biópsia, e em 7 (11,7%) não foi encontrada nenhuma informação. Dos 30 casos onde a biópsia foi negativa, 22 (73,3%) eram negativos, 1 (3,3%) ASC-US, 2 (6,7%) ASC-H, 1 (3,3%) LSIL e em 4 (13,3%) não foi encontrada nenhuma informação. Dos 30 casos onde a biópsia foi positiva, 21 (70,0%) eram negativos, 4 (13,3%) foram ASC, 1 (3,3%) LSIL, 1 (3,3%) CA invasor e em 3 (100%) não foi encontrada nenhuma informação.

**Tabela 1.** Correlação cito-histológica das mulheres com diagnóstico citológico de ASC, selecionadas no período entre 2002 e 2008, realizados no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz

Diagnóstico citológico	Resultado da biópsia						Total
	Cervicite	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CA <i>in situ</i>	CA invasor	
ASC-US	30 (52,6%)	16 (28,1%)	6 (10,5%)	1 (1,8%)	4 (7,0%)	-	57
ASC-H	-	3 (100%)	-	-	-	-	3
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>60</b>

\* NIC1 – neoplasia intraepitelial cervical grau 1; NIC2 – neoplasia intraepitelial cervical grau 2; NIC3 – neoplasia intraepitelial cervical grau 3; CA – carcinoma invasor; ASC-US – atipias escamosas de significado indeterminado – possivelmente não neoplásicas; ASC-H – atipias escamosas de significado indeterminado – não podendo afastar lesão de alto grau.

O intervalo de tempo entre a realização de exames, como demonstrado na Tabela 4, observamos que, dos 60 casos, 26 (43,3%) realizaram o exame com intervalo de até um ano, 29 (48,33%) fizeram no período de um a três anos, 1 (1,7%) em um período maior que três anos. Em 4 (6,7%) não foi encontrada nenhuma informação.

## DISCUSSÃO

A correlação cito-histológica tem sido apontada como um dos indicadores para medir e garantir a qualidade dos diagnósticos citológicos dos laboratórios de citopatologia envolvidos com programas de prevenção de câncer do colo uterino<sup>17,18</sup>. Em nosso estudo, a correlação cito-

**Tabela 2.** Levantamento de exames citológicos anteriores aos casos de ASC, selecionadas no período entre 2002 e 2008 no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz

Diagnóstico citológico	Citologia anterior							Total
	NEG.	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	CA Invasor	S/I *	
ASC-US	29 (50,9%)	7 (12,3%)	1 (1,7%)	3 (5,3%)	1 (1,7%)	-	16 (28,7%)	57
ASC-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)	-	-	-	-	-	3
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>16</b>	<b>60</b>

\* S/I: sem informação; \* NIC1 – neoplasia intraepitelial cervical grau 1; NIC2 – neoplasia intraepitelial cervical grau 2; NIC3 – neoplasia intraepitelial cervical grau 3; CA – carcinoma invasor; ASC-US – atipias escamosas de significado indeterminado – possivelmente não neoplásicas; ASC-H – atipias escamosas de significado indeterminado – não podendo afastar lesão de alto grau.

**Tabela 3.** Levantamento de exames com citologia posterior à biópsia, que na citologia anterior tinham diagnóstico de ASC, selecionadas no período entre 2002 e 2008, no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz

Biópsia	Citologia posterior							Total
	Negativo	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	CA Invasor	S/I *	
Negativa	22 (73,3%)	1 (3,3%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	-	-	4 (13,3%)	30
NIC 1	16 (84,2%)	3 (15,8%)	-	-	-	-	-	19
NIC 2	2 (33,3%)	1 (16,7%)	-	1 (16,7%)	-	1 (16,7%)	1 (16,7%)	6
NIC 3	-	-	-	-	-	-	1 (100%)	1
CA <i>in situ</i>	3 (75,0%)	-	-	-	-	-	1 (25,0%)	4
CA Invasor	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>60</b>

\* S/I: sem informação; \* NIC1 – neoplasia intraepitelial cervical grau 1; NIC2 – neoplasia intraepitelial cervical grau 2; NIC3 – neoplasia intraepitelial cervical grau 3; CA – carcinoma invasor; ASC-US – atipias escamosas de significado indeterminado – possivelmente não neoplásicas; ASC-H – atipias escamosas de significado indeterminado – não podendo afastar lesão de alto grau.

**Tabela 4.** Intervalo de tempo de realização de exame

Tempo	Nº	%
Até um ano	26	43,33
Um a três anos	29	48,33
Mais de três anos	1	1,67
Sem informação	4	6,67
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100,00</b>

histológica das pacientes com diagnóstico citológico dos 60 casos de ASC mostrou que 52,6% dos casos tiveram diagnóstico negativo na biópsia. Sebastião e col<sup>16</sup> também encontraram porcentagem semelhante quando comparado com a biópsia, 57,3% de citologias com ASC foram reclassificados como negativos, mostrando a importância da realização de programas de controle de qualidade diagnóstica, principalmente para casos de atipias indeterminadas.

Em relação às lesões de baixo grau encontramos 28,1% quando comparado com o diagnóstico da biópsia e 19,3% de lesões de alto grau, sendo 10,53 % de NIC 2, 1,8% de NIC 3 e 7,0% de Ca *in situ*. Já em relação aos diagnósticos citológicos de ASC-H, três casos foram diagnosticados como NIC 1, quando comparado ao diagnóstico das biópsias, mostrando uma supervalorização dos diagnósticos citológicos. A dificuldade em graduar esta categoria diagnóstica pode levar muitas vezes a uma grande variação interobservador, como notamos em nosso estudo Pereira e col.<sup>21</sup> encontraram em sua pesquisa uma variabilidade interobservador significativa, pois de 96 casos diagnosticados como ASCUS, apenas 13 foram classificados como atipias de significado indeterminado. Corte et al<sup>24</sup> constataram também fraca concordância nos diagnósticos de ASC-US e ASC-H, com índices Kappa de 0,321 e 0,135, respectivamente.

Neste estudo encontramos 73,3% casos de citologias que tinham exames anteriores, sendo que nos 26,7% não foi encontrada nenhuma informação. Nos casos sem informação no nosso banco de dados, suspeitamos que estas pacientes possam ter feito o exame em outra Unidade de Saúde ou em outro laboratório não conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS). O mesmo pode ter acontecido aos 11,7% de mulheres que não foram achados

exames posteriores ao resultado histológico positivo neste levantamento.

Os resultados dos exames citológicos anteriores ao ASC apontam que em 50% dos casos os diagnósticos anteriores foram negativos, sendo que os demais 50% foram positivos. Já os resultados dos exames posteriores à biópsia mostraram que em 30 casos onde a biópsia foi negativa, as citologias posteriores foram negativas (73,34%), e em 26,7% dos casos onde a biópsia foi negativa, as citologias posteriores foram positivas. De acordo com Corte et al.<sup>24</sup>, as taxas de resultados falso-negativos que podem variar em torno de 5% a 70%, e os falso-positivos, de 10% a 30%, devem-se a certas limitações como amostra celular insuficiente, preparações inadequadas dos esfregaços, ausência de controle de qualidade dos laboratórios de citopatologia, interpretação inadequada dos achados citológicos e seguimento inadequado das mulheres com esfregaços alterados. Vários autores<sup>25,26,27,28</sup> apontam que 2/3 dos resultados falso-negativos são causados por erros de coleta e os outros são causados devido a erros de escrutínio e interpretação do resultado citológico.

As pacientes (48,3%) deste estudo realizaram exames de Papanicolaou com frequência de um a três anos mostrando que o rastreamento continua eficaz nessa faixa, se aproximando da porcentagem preconizada pelo INCA<sup>15</sup>. A recomendação de *screening* no Brasil segundo trabalho de Martins LFL e col.<sup>29</sup> e em países como o Canadá<sup>30</sup> também segue esta recomendação em intervalos de três anos, após dois exames anuais consecutivos negativos.

Concluimos neste trabalho que os diagnósticos citológicos de ASC, quando comparados com a biópsia, estavam mais frequentemente associados às alterações morfológicas reacionais (52,6%), e 19,3% às lesões intraepiteliais de alto grau, mostrando o valioso papel da correlação cito-histológica, uma vez que apenas o segmento citológico pode ser insuficiente para o diagnóstico morfológico. Salientamos também a necessidade de repetição do exame citológico em 6 meses; se negativo repetir após 6 meses; se positivo encaminhar para colposcopia; para casos de ASC não podendo afastar lesão de alto grau encaminhar para biópsia e colposcopia<sup>31</sup>. A realização de testes de biologia molecular para estudar o comportamento biológico do papilomavírus humano, assim como acompanhar periodicamente os exames anteriores para controle evolutivo dos casos diagnosticados como ASC, é de fundamental importância nestes casos de diagnósticos limítrofes, podendo assim auxiliar na conduta terapêutica destas pacientes.



## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde. [http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versao\\_final.pdf](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versao_final.pdf). Acesso em 26/03/2009.
2. Guerra MR, Gallo CVM, Azevedo G, Mendonça S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol* 2005; 51(3): 227-34.
3. Mendonça VG, Lorenzato FRB, Mendonça JG, Menezes TC, Guimarães MJB. Mortalidade por câncer do colo do útero: características sócio-demográficas das mulheres residentes na cidade de Recife, Pernambuco. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30(5): 248-55.
4. Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LOZ et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev Saúde Pública* 2008; 42(1): 123-30.
5. Ministério da Saúde. (Brasília, DF). Prevenção do câncer do colo uterino, manual técnico para profissionais de saúde: manual técnico. Ministério da Saúde (Brasília); 2002. 8-14. Manual técnico.
6. Fundação Oncocentro de São Paulo. (São Paulo, SP). Condutas clínicas frente aos resultados do exame de Papanicolaou: catálogo. Fundação Oncocentro de São Paulo (São Paulo); 2006. 14-15. Catálogo de distribuição gratuita.
7. Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LOZ et al. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. *Rev Saúde Pública* 2008; 42(3): 411-9.
8. Amaral RG, Ribeiro AA, Miranda FA, Tavares SBN, Souza NLA, Manrique EJC et al. Fatores que podem comprometer a qualidade dos exames citopatológicos no rastreamento do câncer do colo do útero. *RBAC* 2006; 38(1): 3-6.
9. Thuler LCS. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30(5): 216-18.
10. Arcuri RA, Cunha KCF, Alves EC, Castro AA, Maciel RA, Rosmanino AC et al. Controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica: um estudo de 48.355 casos. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38(2): 141-7.
11. Junior JE, Cavalcante DIM, Dias MTMP, Alves RM, Queiroz GC, Proença AR. Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS) – estudo de 208 casos. *RBGO* 2000; 22(3): 135-9.
12. Souza JHAS, Kalil IV, Leite JM, Geber S. Avaliação de lâminas de colpocitologia oncótica previamente diagnosticadas como ASCUS: comparação interensaio e interobservadores. *RBGO* 2004; 26(3): 233-40.
13. Silveira LMS, Mendes JC, Pereira IP. *NewsLab* 2007; 82: 170-82.
14. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 946-54.
15. Slawson DC, Bennett JH, Herman JM. Follow-up Papanicolaou smear for cervical atypia: are we missing significant disease? *J Fam Pract* 1993; 36: 289-93.
16. Sebastião APM, Noronha L, Scheffel DLH, Garcia MJ, Carvalho NS, Collaço LM, Bleggi-Torres LF. Estudo das atipias indeterminadas em relação à prevalência e ao percentual de discordância nos casos do Programa de Prevenção do Câncer Uterino do Paraná. *Bras Patol Med Lab* 2004; 40(6): 431-8.
17. Di Loreto C, Maeda MYS, Utogawa ML, Longatto Filho A, Alves VAF. Garantia de qualidade em citopatologia: aspectos da correlação cito-histológica. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(3):195-8.
18. Joste NE, Crum CP, Cibas ES. Cytology/histologic correlation for quality control in cervico-vaginal: cytology experience with 1.582 paired cases. *Am J Pathol* 1995; 103:32-4.
19. Strander B, Andersson-Ellstro A, Milsom I, Radberg T, Ryd W. Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program. *Cancer Cytopathol* 2007;111(5): 285-91.
20. Wong AK, Chan RCK, Nichols WS, Bose S. Human Papillomavirus (HPV) in atypical squamous cervical cytology: the invader HPV Test as a new screening assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46(3) 869-75.
21. Pereira SMM, Yamamoto LSU, Aguiar LS, Makabe S, Marques JÁ, Maeda MYS, Santoto CL, Utogawa ML, Longatto Filho A. O impacto do diagnóstico citológico de atipias indeterminadas no Sistema Único de Saúde. *DST – J Bras. Doenças Sex Transm* 2005; 17(4):251-4.
22. Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42(5): 351-73.
23. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkins EJ. *Histological typing of female genital tract tumors. World Health Organization International Histological Classification of Tumors. 2th ed. Berlin: Springer-Verlag;1994.*
24. Corte LMDC, Gonsalves JC, Silva CS, Dutra MF, Rocha DB, Urtiz CB et al. Análise da concordância interobservadores em exames de Papanicolaou. *News Lab* 2007; 80: 98-106.
25. Lapin GA, Derchain SFM, Tambascia J. Comparação entre a colpocitologia oncológica de encaminhamento e a da gravidade das lesões cervicais intra-epiteliais. *Rev Saúde Pública* 2000; 34(2): 120-5.
26. Nanda K, Mccrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou Test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Int Med* 2000; 132(10): 810-9.
27. Pinho AA, Mattos MCFI. Validade da citologia cérvico-vaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. *J Bras de Patol e Med Lab* 2002; 38(3): 225-31.
28. Santos ALE, Derchain SFM, Calvert EB, Martins MR, Duflath RM, Martinez EZ. Desempenho do exame colpocitológico com revisão por diferentes observadores e da captura híbrida II no diagnóstico da neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(4): 1029-37.
29. Martins LFL, Thuler LCS, Valente JG. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura – *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(8):485-92.
30. Duarte-Franco E, Franco EL. Cancer of the uterine cervix. *BMC Women's Health*.2004;4(Suppl 1):S13.
31. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Nomenclatura Brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. *Rev Bras Ginecol* 2006;28(8):486-504.

# Cervical medulla as laboratory diagnosis material for Rabies

## Medula cervical como material para diagnóstico laboratorial da Raiva

RIALA6/1201

Benedito Neilson ROLIM<sup>1</sup>, Maria Fátima da Silva TEIXEIRA\*<sup>1</sup>, Edmara Chaves COSTA<sup>1</sup>, Nelio Batista de MORAIS<sup>2</sup>, Katariny Michelli de Araújo PINHEIRO<sup>2</sup>, Tania Valeska Medeiros DANTAS<sup>1</sup>, Suzana Aparecida Costa de ARAUJO<sup>1</sup>, Valeska Shelda Pessoa de MELO<sup>2</sup>, Aryana Lushese Vasconcelos de Lima FEITOSA<sup>2</sup>, Phyllis Catharina ROMIJN<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: Virology Laboratory of the Post-Graduate Program in Veterinary Science at the State University Ceará, Av. Paranjana, 1700, Itapery, Fortaleza, CE, Brasil, CEP 60740-903, email: labovirfavetuece@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Virology Laboratory of the Post-Graduate Program in Veterinary Science at the State University Ceara, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Ceara Secretariat of Health, CE, Brazil.

<sup>3</sup>Pesagro-Rio de Janeiro and Rio de Janeiro Ceará Secretariat of Health, RJ, Brasil.

Recebido: 30.07.2008 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### ABSTRACT

Rabies is a contagious, neurotropic zoonosis associated with abandoned street dogs and low immunity. The disease has a reduced laboratory diagnosis rate because it is difficult to gather and transport sample material (brain). Based on this challenge, we studied the cervical medulla (CNS) as the pathway of the Rabies virus from the body to the brain. The cervical medulla was an ideal candidate for our study because its anatomy and location make it an easy material to gather. Our objective was to analyse the use of cervical medulla in the laboratory diagnosis of Rabies. Rabies viruses were intramuscularly inoculated into five *Rattus* species. After death, the brain and cervical medulla of each animal were intra-cerebrally macerated and inoculated. Five *Rattus* species were used in the study (a total of twenty-five brains). Twenty-five of the medullas were 100% positive for Rabies using the direct immunofluorescence (DIF) test and intracerebral inoculation. Overall, there was agreement between the analyses of the brains and the cervical medullas. Therefore, we propose the use of cervical medulla as a material for the laboratory diagnosis of Rabies.

**Key words.** rabies, diagnosis, laboratory, cervical medulla.

### RESUMO

A Raiva é uma zoonose neurotrópica infecto-contagiosa, cuja persistência está associada: aos cães abandonados nas ruas, baixa imunidade, reduzida procura pelo diagnóstico laboratorial devido a difícil coleta e transporte do material (cérebro). Portanto, justifica-se o estudo da medula cervical (SNC), por ser via obrigatória dos vírus rábicos para o cérebro e deste para todo corpo, cuja anatomia e localização, facilitam a coleta. Assim, objetivou-se testar sua eficácia como material para o diagnóstico laboratorial da Raiva. Para tanto, inoculou-se vírus da raiva intramuscular em cinco *Rattus*. Após o óbito, o cérebro e a medula cervical de cada animal foram macerados e inoculados intracerebral em cinco *Rattus* (repetições). Os 25 cérebros e 25 medulas foram 100% positivo para Raiva, pelas provas de imunofluorescência e inoculação intracerebral. Apesar da concordância entre o cérebro e a medula cervical, este estudo propõe a utilização da medula cervical como material para o diagnóstico laboratorial da Raiva.

**Palavras-chave.** raiva, diagnóstico, medula cervical.

## INTRODUCTION

Rabies is a contagious zoonosis caused by a neurotropic virus that acts on the Central Nervous System (CNS). The virus produces an acute and deadly encephalomyelitis because its replication leads to nervous system cell destruction<sup>1</sup>. The virus often causes behavioural and motor alterations, including restlessness, rage, aggressiveness and hind limb paralysis<sup>2</sup>.

Rabies infection in humans is associated with domestic animals of low immunity, an overpopulation of abandoned cats and dogs, and a failure or lack of epidemiological monitoring. According to OPS<sup>3</sup>, 0.1% of annual samples from the canine population should undergo Rabies laboratory diagnosis. Despite these recommendations, there are challenges related to the gathering, preservation, and transport of these samples (brain, head, or whole animal).

According to the literature, the encephalus is the sample of choice for post-mortem diagnosis of Rabies in animals, but the diagnostic procedure must be completed quickly. The sample should be preserved on ice and transported to the laboratory<sup>4</sup> in a rapid fashion. Animals suspected of having Rabies often arrive whole, or with their head inside an appropriate container. These methods lead to an increased infection risk to personnel during transportation to the laboratory. In the state of Ceara, samples for Rabies examination are received 24 hours a day, including weekends and holidays. After long holidays, the freezer used to store the samples (whole animals or heads) often gets full. Frequently, the cover to the freezer is left half-open. Consequently, the samples are inappropriately conserved, leading to the loss of samples and serious consequences for the victims.

A study of the cervical medulla is justifiable because it is a part of the CNS. It is an obligatory pathway of the Rabies virus to the brain (where the virus multiplies). Once the virus is in the brain, it disseminates to the rest of the body. This study aims to test the efficiency of the cervical medulla as a sample for Rabies diagnosis.

The anatomy and location of the cervical medulla make it easy to gather, store, and transport. The use of the cervical medulla may reduce the risk of infection due to mishandling of materials. This reduction may lead to a decrease in human prophylactic treatments. A decrease in prophylactic vaccination would strongly contribute to epidemiological monitoring and disease control. The objective of this study was to test the effectiveness of

the cervical medulla as an alternative material for the laboratory diagnosis of Rabies.

## METHODS AND MATERIAL

The experiment was carried out at the Virology Laboratory of the Post-Graduate Program in Veterinary Science at the State University Ceara and at the Laboratory of Medical Entomology of the state of Ceará Secretariat of Health. Work was also completed at the Rabies Diagnostic Laboratory in the Zoonosis Control Center at Crato-CCZC.

### ■ Viruses used in the experiment

A sample of dog brain that was positive for Rabies was kindly donated by the Rabies Diagnostic Laboratory in the Zoonosis Control Center at Crato-CCZC. To create samples with easily identifiable anatomy and increased reliability, the virus from this sample was replicated. To accomplish this, 5 g of the sample was macerated in 95 mL of sodium chloride solution (NaCl 0.9%) and filtered through gauze. After this filtration, 0.3 mL was inoculated by intra-cerebral (IC) into three organisms of *Rattus norvegicus wistar*. The first animal to die was confirmed to have Rabies. Laboratory corroboration was completed throughout the experiment.

### ■ Animals used in the experiment

To perform this experiment, 65 *Rattus norvegicus wistar* from the Central Animal House – BIOCEM of the Federal University of Ceará-UFC were used. All of the protocols used were in accordance with the ethics committee for the use of animals-UECE, number 07175988-5.

Thirty-day-old rats of both genders with live weights between 85 g and 100 g were used. The rats were assigned randomly into two groups and eleven subgroups (each subgroup contained five animals). The rats remained confined in 13 cages appropriate for *R. norvegicus* during the entire experiment.

### ■ Experimental Design

The experiment was conducted in three stages:

#### *1st Stage (two groups with five animals each)*

*Group I:* served as the control group. Five *R. norvegicus* were inoculated with 0.5 mL of a sodium chloride physiological solution (NaCl 0.9%) by an intramuscular

route (IM). This administration corresponded to the same dose and solution as the diluent in the experiment.

**Group II:** served as the challenge group and was infected by the Rabies virus. The first rat brain that evolved to obit was macerated in 95 mL of sodium chloride physiological solution (NaCl 0.9%) and filtered through gauze. This treatment resulted in a suspension containing first passage Rabies virus. A half millilitre of the solution was inoculated intramuscularly into the inner surface of the thigh of each of the five *R. norvegicus* in Group II. According to Germano<sup>5</sup>, an observation time of 30 days was set. After death, the cervical medulla and the brain of each rodent were gathered separately using clean utensils. The laboratory diagnoses were 100% positive by direct immunofluorescence (IFD) and biological proofs (IC).

### 2nd Stage

Every *R. norvegicus* in experimental group II tested positive for Rabies. Throughout the experiment, the samples were stored in individual containers. The brain and medullar samples were macerated separately in 10ml sodium chloride physiological solution (NaCl 0.9%) and filtered through gauze. This process resulted in five brain filtrates and five medullar filtrates. Five *R. norvegicus* were inoculated with 0.3 mL of brain filtrate by intracerebral administration (IC). The five subgroups (C1; C2; C3; C4; C5) were repeated five times. A total of 25 rodents were challenged with the Rabies virus derived from the brain. Similarly, the medullar filtrates were inoculated by the IC route in five *R. norvegicus*. These five subgroups (M1; M2; M3; M4; M5) underwent five replications, leading to

a total of 25 rodents challenged with Rabies virus from the medullar source.

The control subgroup was inoculated by the IC route with 0.3 mL sodium chloride physiological solution (NaCl 0.9%). This dose correlated with the solution used as diluent in the other experimental groups. Overall, there were a total of eleven subgroups.

### 3rd Stage

The clinical term and the infection onset were monitored in the *R. norvegicus*. The clinical characteristics of the animals that received brain and medullar inoculate were compared to the sham group.

## RESULTS

*Rattus norvegicus* belonging to **Group I** and the control subgroups did not go to obit. Every *Rattus norvegicus winstar* belonging to experimental **Group II** evolved to obit. These rats had a mean incubation time of 15.2 days and a clinical term of 4.2 days.

The rats had clinical findings compatible with Rabies, including isolation from the group, loss of appetite, acute weight loss, bristled hair, agitation, lack of coordination, paralysis, death, and aggressive rage. These findings demonstrate the pathogenic power of the inoculated suspension.

The laboratory results of the brain and cervical medulla from *Rattus* belonging to experimental Group II were 100% positive for Rabies. This finding demonstrates the presence of the virus in the cervical medulla and brain. There was perfect conformity of the techniques

**Table 1.** Clinical observation terms and results of brain and cervical medulla samples using IFD and IC proofs

Group II Challenge	Clinical observation		Brain		Medulla	
	Incubation T. (I.T.)	Clinical T. (C.T.)	DIF	IC	DIF	IC
<i>R. norvegicus</i> I	14	3	+	+	+	+
<i>R. norvegicus</i> II	14	4	+	+	+	+
<i>R. norvegicus</i> III	15	5	+	+	+	+
<i>R. norvegicus</i> IV	16	4	+	+	+	+
<i>R. norvegicus</i> V	17	5	+	+	+	+
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>21</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

DIF – Direct Immunofluorescence; IC – intracerebral inoculation.

of direct immunofluorescence (DIF) and intra-cerebral inoculation (IC) (Table 1).

Laboratory diagnoses of 25 brain samples and 25 cervical medulla samples (repetition subgroups) were 100% positive for Rabies using DIF. These results corroborated the presence of the Rabies virus inside both regions of the Central Nervous System (Table 2).

The mean incubation terms in the subgroups inoculated with brain and medulla filtrates were 6.36 and 6.2 days, respectively. The mean clinical terms of the subgroups inoculated with medullar filtrates were 2.88 and 2.8 days, respectively.

## DISCUSSION

Comparison of the results of the brain and medullar samples in this experiment demonstrated agreement between these two areas of the nervous system. These results are in agreement with those reported by Ito<sup>4</sup>, who detected 100% Rabies antigen in the brain and spinal medulla of naturally infected dogs using direct immunofluorescence (DIF) and intra-inoculation (IC). This group utilised intramuscular inoculation (IM) at the masseter with a Rabies virus suspension.

In this experiment, Rabies virus was detected in the brain and medullar tissue of every *Rattus norvegicus winstar* inoculated with Rabies virus by the intramuscular route. This finding was in agreement with the results of Germano<sup>5</sup>, who analysed viral dissemination through

different organs (brain, medulla, tongue, heart, lungs, kidneys and liver). Germano used three groups of mice infected by the intramuscular route with three different Rabies strains. Jales and Nigéria used two canines and one desmodine (DR19). Both groups detected Rabies antigen inside the brain and medulla of every animal, regardless of the inoculated strain. This consistency did not occur with the rest of the researched organs. These results disagree with those found by Silva et al.<sup>6</sup>, who reported hydrophobic dogs with the virus in their salivary glands and absent in their encephalus. However, Heuschele<sup>7</sup> stated that the neurotropism of the Rabies virus was not controversial. The studies of Fishbein, Robinson<sup>8</sup> and Tsiang<sup>9</sup> demonstrated that the Rabies virus reaches the spinal medulla via a centripetal mechanism after reaching the peripheral nerves. Using this mechanism, it invariably reaches the brain and replicates with great intensity.

In the first stage of this study, a natural infection (infected animal bite) was simulated in *Rattus norvegicus winstar*. Brain filtrate containing Rabies virus was inoculated intramuscularly, leading to the death of all animals. These results are in agreement with Tsiang<sup>9</sup>. After inoculation with an animal bite, the Rabies virus reaches sensory and/or motor nerve endings, or remains for an unidentified time in the affected muscle cells. At these locations, the process of viral amplification occurs, leading to propitious nerve infection.

According to Germano et al.<sup>5</sup>, the material of choice for the laboratory diagnosis of Rabies is the

**Table 2.** Consolidated diagnostic and clinical monitoring results from five repetitions of each subgroup

Subgroups	Repetitions	Inoculated Material	Diagnostic and Clinical monitoring		
			DIF	I.T.	C. T.
C1	5	Brain filtrate	+	7	2,8
M1	5	Medullar Filtrate	+	6,4	2,6
C2	5	Brain filtrate	+	5,8	3
M2	5	Medullar Filtrate	+	5,8	2,6
C3	5	Brain filtrate	+	6,2	3
M3	5	Medullar Filtrate	+	6,4	2,8
C4	5	Brain filtrate	+	6,6	2,8
M4	5	Medullar Filtrate	+	6	2,8
C5	5	Brain filtrate	+	6,2	2,8
M5	5	Medullar Filtrate	+	6,4	3,2

DIF – Direct Immunofluorescence; I.T. – incubation time; C.T – clinic time.



Central Nervous System (hippocampus, cerebral trunk, thalamus, cortex, cerebellum and medulla oblongata). This rule does not apply to *equidae* species (horse, ass, and donkey), except in cases where the material gathered in these animals is the medulla. In this paper, we conclude that Rabies viruses are present in the cervical medulla of animals killed by Rabies.

In this study, agreement was found between the tests on the brain and the cervical medulla. The sensitivities of immunofluorescence and intracerebral inoculation were similar to those reported by Smith<sup>10</sup>. Smith showed that the brain and cervical marrow are the best areas for the laboratory diagnosis of Rabies. These areas have sensitivities that are greater than the hippocampal, cortical and cerebellar areas.

Charlton<sup>11</sup>, cited by Carrieri<sup>12</sup>, observed that human paralytic Rabies is characterised by the destruction of nerve cells, microglial proliferation, and perivascular infiltration. These findings are mainly observed in the brain and cervical marrow. In classic Rabies (furious), the inflammatory reaction, vascular modifications, and inclusion bodies are more diffuse in the thalamus, hypothalamus, cerebellum and cervical medulla. Perl and Good<sup>13</sup> confirmed that paralytic Rabies lesions are always found in the cervical medulla and brain. The results of these studies showed the inevitable presence of large amounts of viral antigen in the brain and cervical medulla. Therefore, these two CNS regions should be targeted for laboratory diagnosis.

In this experiment, Rabies antigens were present in all medullar samples of animals that died. This finding is in agreement with those of Lee and Becker<sup>14</sup>, Ito<sup>7</sup>, Germano et al.<sup>5</sup>, Bingham and Van der Merwe<sup>15</sup>, and Rolim et al.<sup>16</sup>. Due to its location and anatomy, several features of the medulla make it an ideal sample. The medulla can be gathered without contamination, is easy to contain, is easy to transport and store, has a reduced infection risk during manipulation, and has greater resistance to decomposition. Overall, these qualities paired with credible and incontestable results make the routine use of this organ feasible in the laboratory diagnosis of Rabies.

## CONCLUSION

The cervical medulla is the region of the CNS that is most suitable for the laboratory diagnosis of Rabies using

direct immunofluorescence (IFD) and intracerebral inoculation (CI).

Rabies viruses, regardless of the inoculation site, are present in the cervical medulla and brain of animals killed by Rabies.

---

## AGRADECIMENTOS

The authors thank the Graduate Program in Veterinary Sciences at the State University of Ceará (Veterinary Sciences Pos-Graduation Program of the Ceara State University), the Central Biotery of the Universidade Federal do Ceará (Federal University of Ceará), the Medical Entomology Laboratory of the Ceará State Secretariat for Health, and the Ceará Foundation for Support for Scientific and Technological Development. The authors would also like to thank the teachers, employees, friends, family and others that directly or indirectly contributed to this study.

---

## REFERENCES

1. Tordo N, Charlton K, Wandeler AI. Rhabdoviruses: Rabies. *Microbiol and microbial infect* 1998; 01: 665-92.
2. Pena GO. Doenças infecciosas e parasitárias: Ministério da saúde, Fundação Nacional de Saúde. Brasília - Brasil, 1998.
3. Organización Panamericana de La Salud-OPS. Eliminación de La rabia humana transmitida por perros en América Latina: Análisis de la situación, Washington, D.C: OPS, 2005.
4. Ito FH, Vasconcellos SA, Erbolato EB, Macruz R, Cortez JA. Rabies virus in different segments of brain and apinal cord of naturally and experimentally infected dogs. *Int J Zoon* 1985; 12:98-104.
5. Germano PI, Silva EV, Miguel O, Ishizuka MM. Avaliação de três cepas de vírus rábico. antigenicamente distintas, em camundongos. II - Estudo da disseminação viral por diferentes órgãos. *Rev Saúde Publ* 1998; 22: 1-11.
6. Silva RA, Silva NM. Infecção rábica em cão com presença de vírus virulento nas glândulas salivares e a virulência no encéfalo. *Res Vet* 1973; 8:89-90.
7. Heuschele WP. Rabies and other viral diseases. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1987; 3: 45-59.
8. Fishbein DB, Robinson LE. Current concepts: Rabies. *The New England J. Medicine* 1993; 329:1632-8.
9. Tsiang H. Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the neuromuscular junction. *Rev Infect Dis* 1998; 10:733-8.
10. Smith JS. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of disease in the United States. *Clin Microbiol Vet* 1996; 9: 166-76.
11. Charlton KM. The pathogenesis of rabies. In: Campbell M, Charlton K.M. (eds). *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988.

12. Carrieri ML, Peixoto ZMP, Paciencia MLB, Kotait I, Germano PML. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. *J Virol Methods*, 2006.
13. Perl, DP, Good, PF. The pathology of rabies in the central nervous system. *The Natural History of Rabies*, Boca Ratón 1991; 2: 164-88.
14. Lee TK, Becker ME. Validity of spinal cord examination as a substitutive procedure for routine rabies diagnosis. *Appl Microbiol* 1972; 24: 714-6.
15. Bingham J, Van der Merwe M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies Fluorescent antibody test. *J Virol Methods* 2002; 101: 85-94.
16. Rolim BN, Teixeira MFS, Rolim JBS. Avaliação dos casos de raiva humana transmitida por cães: na América Latina, no Brasil, no Ceará e em Fortaleza, 1990 a 2003. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza - Brasil, 2006.

## Growth of rubella virus into SIRC (rabbit cornea cell line) using various culture media

Cultivo do vírus da rubéola em SIRC (linhagem celular de cornea de Coelho) em vários meios de cultura

RIALA6/1202

Cristina Adelaide FIGUEIREDO<sup>1\*</sup>, Maria Isabel de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Ana Maria Sardinha AFONSO<sup>1</sup>, Suely Pires CURTI<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Seção Vírus Produtores de Exantemas, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: figueiredocris@uol.com.br

<sup>1</sup>Seção Vírus Produtores de Exantemas, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil. Recebido: 18.02.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### ABSTRACT

The present study evaluated the efficacy of various culture media for performing the isolation and growth of the rubella virus inoculated into SIRC cells. Rubella virus RA-27/3 strain and RVi/SãoPaulo/BRA99 wild type strain (GenBank number DQ458965) were inoculated into SIRC cell line and cultivated in 199, DMEM, MEM and RPMI media. The inoculated cells when examined on phase contrast microscopy showed the characteristic rounded and multipolar cells. The CPE was observed at the first 48 hours cultivation in the respective tested media. The curve of the infectivity increase was higher in the cultures maintained in DMEM and RPMI media. Hence, the SIRC cellular lineage cultivated in DMEM or RPMI media is an excellent substratum for performing the rubella virus isolation. These findings are relevant since the SIRC has been one of the few cell lines described in the literature which presents a cytopathic effect, and on that account it can be useful for carrying out the virus isolation from clinical specimens.

**Key words.** rubella virus, SIRC cells, virus isolation, cytopathic effect.

### RESUMO

O presente estudo avaliou a eficiência de vários meios de cultura no isolamento e crescimento do vírus da rubéola inoculado na linhagem celular SIRC. O vírus da rubéola padrão RA27/3 e o vírus selvagem RVi/SãoPaulo/BRA99 (GenBank número DQ458965) foram inoculados na linhagem celular SIRC e cultivada nos meios de cultura 199, DMEM, MEM e RPMI. As células inoculadas observadas em microscopia de fase apresentaram aspecto arredondado, com produção de células multinucleadas. O efeito citopático foi observado após 48 horas de cultivo nos respectivos meios de cultura testados e a curva do crescimento da infectividade do vírus foi maior nas células cultivadas em meios DMEM e RPMI. Os resultados obtidos indicam que SIRC é um ótimo substrato para crescimento do vírus da rubéola, uma vez que poucas linhagens celulares descritas na literatura apresentam efeito citopático considerável e mostram que o potencial dessa linhagem celular ser utilizadas para efetuar o isolamento do vírus da rubéola em amostras clínicas.

**Palavras-chave.** vírus da rubéola, células SIRC, isolamento viral, efeito citopático.

## INTRODUCTION

The discovery in the early 1900s that human cells could be propagated in vitro provided virologists with an alternative to embryonated eggs and laboratory animals for in vitro isolation of viruses. Cell cultures, which are derived from dispersed cells taken from original tissue and disaggregated by enzymatic, mechanical, or chemical means, provided large numbers of cells suitable for virus isolation<sup>1</sup>. Although virus isolation in cell cultures was employed by research laboratories by the early 1960s, diagnostic services were very limited, varying from laboratory to laboratory and often not available at all, except in major medical centers. For viral diagnosis, isolation is sensitive because a positive result can be obtained with a single infectious virion<sup>2</sup>. In addition, viral isolation permits the detection of unexpected viruses, new viruses, or multiple viruses in a specimen.

Rubella was initially known as “German Measles”, as it was first described by two German physicians. It is generally a mild disease and received little attention until 1941, when Norman MacAlister Gregg recognized its association with congenital defects<sup>3</sup>. The risk of congenital defects was underestimated until the 1960s, when techniques were developed to identify the virus. In São Paulo, Brazil the rubella immunization program began in 1992 with the introduction of MMR (measles/mumps/rubella) vaccine or MR (measles/rubella) vaccine to the basic immunizations schedule. In our laboratory the routine diagnosis of rubella virus (RV) infections is based on detection of RV-specific IgM in serum, isolation of rubella virus in cell culture and PCR<sup>5,6,7</sup>. RV replicates in a variety of cell culture systems, primary cells and continuous cell lines<sup>1,2,7,8,9</sup>. The virus isolation permits the detection of a wide variety of virus types including new or antigenic variants of known viruses. However, the presence of rubella virus indicated by the typical cytopathic effect (CPE) in infected cells, is difficult and laborious to detect. The objective of this study was to evaluate the importance of culture medium for the isolation and growth of the rubella virus inoculated in SIRC cells

## MATERIAL AND METHODS

### ■ Media

The SIRC cells were grown in: (1) 199; (2) Dulbecco Minimum Eagle Essential Medium (DMEM, Gibco); (3)

MEM; (4) RPMI 1640) media (Invitrogen/Life, Carlsbad, CA). All media were supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen/Life, Carlsbad, CA), 20mM L-glutamine and contained 0.1% gentamicin.

### ■ Virus stock

The rubella virus RA-27/3 strain (Meruvax II, Merck, Sharp and Dohme) and RVi/SãoPaulo/BRA99 wild type strain isolated in our laboratory (GenBank number DQ458965) was seeded in Vero cells (African green monkey kidney — ATCC CCL-81) and titrated, as previously described by Kaerber<sup>8</sup>.

### ■ Cells and Virus

The SIRC (Statens Serum Institute Rabbit Corneal Epithelial Cell line - ATCC CL 60) were adapted to 199, DMEM, MEM and RPMI media, through five serial passages. Cells were cultivated in 75cm<sup>2</sup> plastic cell culture flasks contained 5x10<sup>5</sup> cells/mL. After five passage, SIRC cells were grown in 24 well plates in each media supplemented with 2mM L-glutamine and 10% FBS. Plates were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. A serial tenfold dilution of the rubella virus (RA 27/3 and RVi/SãoPaulo/BRA99) was prepared in medium 1, 2, 3 and 4. The confluent cells were inoculated with 200mL of the virus dilutions in quadruplicates, for each medium. After one hour of adsorption at room temperature, each well received 2mL of medium with 2% FBS. Uninfected cultures were also prepared and treated identically as controls. Plate cultures were observed for CPE daily during seven days, when the test was concluded. Fifty per cent infectivity end points were calculated by the method of Karber (8).

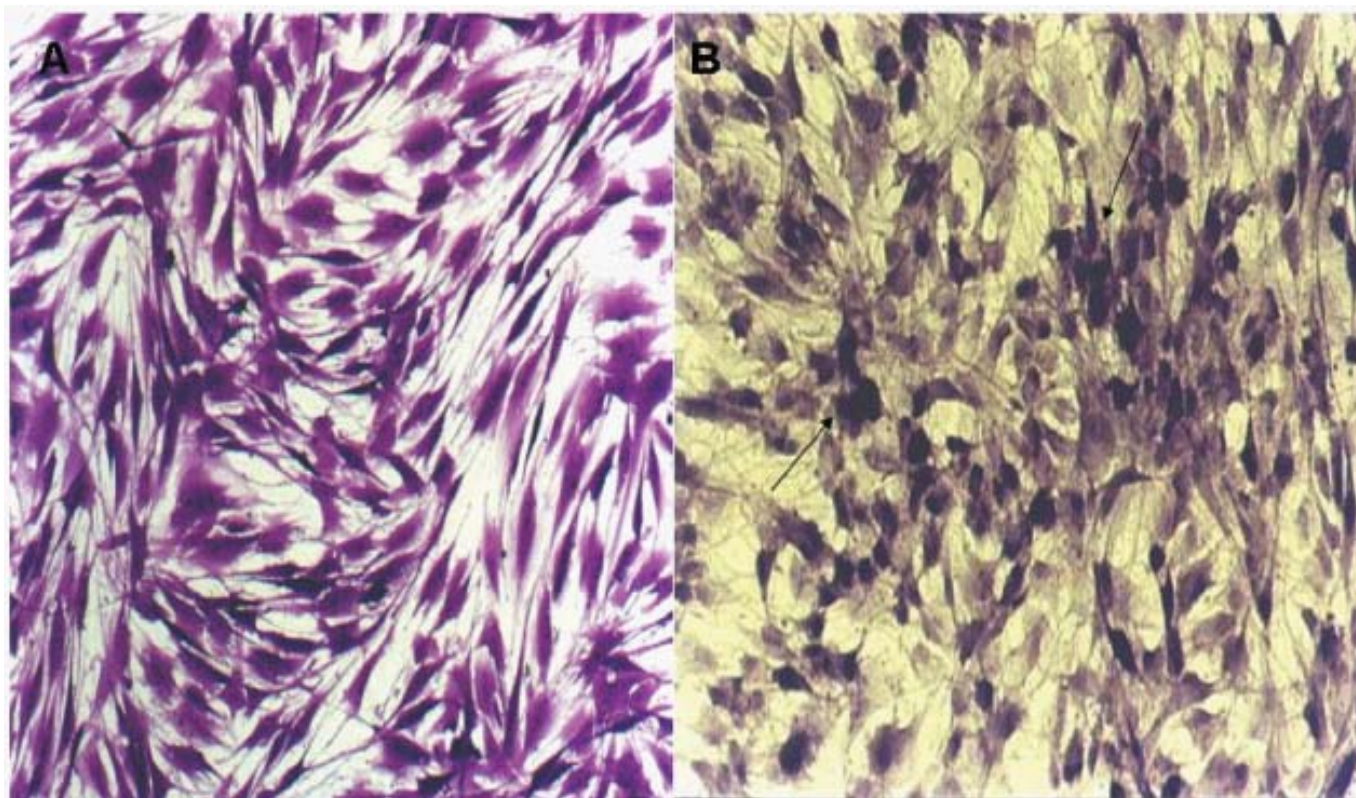
### ■ Optic microscopy

SIRC cells infected cultures and controls were routinely examined by phase-contrast microscopy and photographed. For staining cell cultures with toluidine blue, SIRC infected cultures and controls on coverslips were washed with PBS, fixed with 1% glutaraldehyde in 0.15M phosphate buffer at pH 7.2 for 1 hour and then stained with 1% toluidine blue, pH 3.5 for 5 minutes. After fixation, a brief water rinse was carried out and the cultures were then immediately examined and photographed.

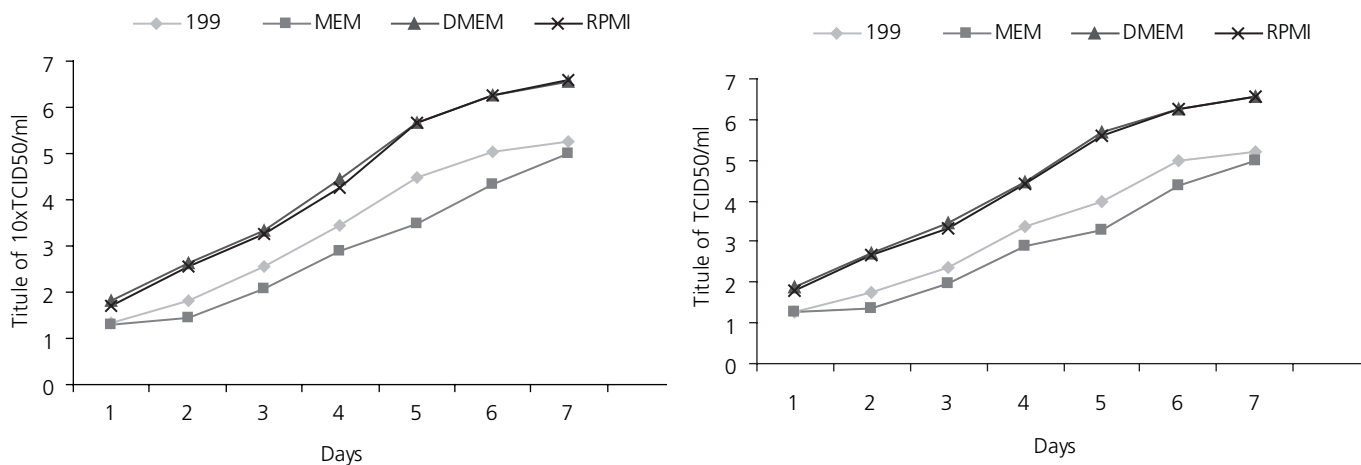
## RESULTS

The SIRC cells are fibroblastic type and form a dense monolayer (Figure 1a). After changing to the various





**Figure 1.** Cytopathic effect of rubella virus in SIRC cell line. A: Uninfected; B: Cells infected after 8 days with wild type strain (DQ4589) cultivated in DMEM. Observe the cytopathic effect is characterized by a formation of foci consisting of small, circular cells, (100x),



**Figure 2.** A- Curve of increased infectivity of SIRC cells infected with the strain RA27/3 of the rubella virus during 7 days and B- Curve of increased infectivity of SIRC cells infected with strain. DQ458965



maintenance media the cultures not developed differences in your morphology. The SIRC cells showed best adaptation to two media: DMEM and RPMI-1640, not showing any significant signs of degeneration until the 12<sup>th</sup> day. In the 199 and MEM medium, dead cells were observed in the supernatant, after the 7<sup>th</sup> day and the monolayer showed signs of loss of confluency. The MEM was the least adequate, once in the 6<sup>th</sup> passage more than 50% of the cells were dead, the cellular monolayer was not confluent in several points and the monolayer was unfastened. The cells cultivated in DMEM/RPMI had good aspect until the 15<sup>th</sup> day. After the 15<sup>th</sup> day, the cells showed a progressive rise in the number of unfastened cell on the supernatant. The cytopathic effect in SIRC cells inoculated with rubella virus was observed after 48 hours of the inoculation in all media tested. The early cytopathic effect in all cultures is characterized by a formation of foci consisting of rounding, along with bipolar and multipolar cells. In media 1 and 3, the foci disappear very rapidly and fast degeneration of the cell sheet takes place. In media 2 and 4, various foci can be observed for approximately one week after the inoculation, when a complete degeneration of the cell sheet eventually occurs. However, SIRC cells inoculated in DMEM or RPMI showed about 90% of the cell altered by CPE by day 8 (Figure 1B). Infective titers of RA27/3 strain and RVi/ /Sao Paulo.BRA/99 in SIRC cells cultivated with various medium are shown in Figure 2A and B. The maximum virus titers are reached approximately seven days after inoculation with all maintenance media, nevertheless, the titrations are higher in cultures maintained on media 2, and 4 while titer values in media 1 and 3 cultures are lower.

## DISCUSSION

Rubella is a common cause of childhood rash and fever. Its public health importance is related with the teratogenic effects of primary rubella infection in pregnant women<sup>2,3</sup>. Congenital rubella syndrome may be diagnosed through the classic triad of clinical signs, but many infants only have one of these clinical signs or may present neonatal signs earlier. The clinical diagnosis is further more elusive by the fact that maternal infection is often subclinical<sup>3</sup>. A definitive diagnosis of rubella virus infection is achieved with serological tests and virus isolation.

The present study reports the SIRC cultures maintained on different media as well as the influence of these media on the titers of rubella virus. In our results,

the morphology of the SIRC cells was not affected by change of media. A difference, however, was observed in the ability of the media to maintain the cells, media 2 and 4 maintaining cultures in good condition for the 15-day period of observation. Furthermore, the cells did not develop non-specific degenerations which are observed in other media tested. The results of the growth of rubella virus in SIRC cells are in agreement with Leerhoy et al., 1965;1968<sup>12,13</sup>. The rubella virus in SIRC cells inoculated with RA27-3 and RVi/SãoPaulo/BRA99 showed clear and readily detectable CPE and these cell have been shown to be as effective for primary isolation of rubella virus and cells cultivated with DMEM or RPMI produced earlier and more extensive cytopathic effect. Titration of rubella virus in SIRC cultures showed differences in the growth of the virus and titer of approximately 0.5-1 log<sup>10</sup> depending on maintenance media. The maximal titers 6.40-6.45 log<sub>10</sub> were obtained in media 2 and 4. The low replication level of RV in SIRC maintained in media 1 and 3 can be related to the fact that few cell receptors were exposed to virus. The media used can promote easy virus attachment to the cell, by exposing virus receptors. However, other factors, though, could be influencing the viral yield, such as temperature, pH, oxygen concentration etc<sup>11</sup>. The present paper demonstrates that the SIRC cell line cultivated in DMEM and RPMI could be included in the group of cell lines in which CPE induced by RV is observed within 2-5 days after inoculation. The isolation of rubella virus is extremely valuable for molecular epidemiology studies as a rapid and convenient method for obtaining field isolates<sup>14</sup> (WHO,2005).

## REFERENCES

1. Best JM. and Banatvala JE. Rubella. In: A.J. Zuckerman, J.E. Banatvala and J.R. Pattison, eds. Principles and practice of clinical virology, John Wiley & Sons, Chichester 2000: 387-418
2. Wolinsky JS. 2006 Rubella in Fields Virology. 3<sup>rd</sup> ed, New York: Lippincott-Raven, p. 899-930.
3. Best JM. Rubella. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 2007, 12: 182-92.
4. Figueiredo CA, Klautau GB, Afonso AM, Castrignano SB, Oliveira MI, Curti SP, Squarcina GG, Narimatsu K, Rasslan Z, Lima CA, Golin V, Tadeo EF, Spagunolo FJ, Cataldo B, Durigon EL. Isolation and genotype analysis of rubella virus from a case of Guillain-Barré syndrome. *J Clin Virol*. 2008, 43(3):343-5.
5. Figueiredo CA, Oliveira MI, Afonso AMS, et al. Isolation of the wild-type rubella virus in rabbit kidney cell line RC-IAL. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40 (2): 69-73.

6. Figueiredo CA, Oliveira MI, Curti SP, et AL. RC-IAL Cell Line: Sensitivity Of Rubella Virus Grow. *Rev Saúde Pública* 2000; 34(4): 353-7
7. Frey KT. Molecular biology of rubella virus. *Adv Virus Res* 1994, 44: 69-160.
8. Liebhaber H, Riordam JT, Horstmann DM. Replication of rubella virus in a continuous line of African green monkey kidney cells (Vero). *Proc Soc Exp Bio Med* 1967, 125:636-43.
9. Belcourt RJ, Wong FC, Walcroft MJ. Growth of rubella virus in rabbit fetal tissues and cell cultures. *Can J Public Health* 1965, 56:253-4.
10. Karber, G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharmako.* 1931, 162: 480-3.
11. Freshney RI. 2000 Culture of animal cells, a manual of basic technique, 4<sup>th</sup> ed. Wiley Liss, New York, NY.
12. Leerhoy, J. Growth of rubella virus in a rabbit cornea cell line SIRC. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968, 74(3):460-1.
13. Leerhoy, J. Cytopathic Effect Of Rubella Virus In A Rabbit-Cornea Cell Line. *Science* 1965, 6(149): 633-4.
14. World Health Organization, Standardization of the nomeclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2005, 80(14):126-32.

# Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas

## Microbiological quality of minimally processed fruits and vegetables

RIALA6/1203

Taline Fernanda SMANIOTO<sup>1</sup>, Natália Jordão PIROLO<sup>1</sup>, Eliane Maria Ravasi Stéfano SIMIONATO<sup>2\*</sup>, Maria Cecília de ARRUDA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Sagrado Coração (USC), Avenida Irmã Arminda 10-50, Jardim Brasil, CEP 17011-160, Bauru, SP, Brasil, e-mail: esimionato@usc.br

<sup>1</sup>Laboratório de Análise de Alimentos, Fundação Veritas, USC, Bauru, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Saúde, USC, Bauru, SP, Brasil.

<sup>3</sup>APTA – Pólo Centro Oeste, Unidade de Pesquisa de Bauru, SP, Brasil.

Recebido: 09.02.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de alimentos minimamente processados, com base na Legislação Brasileira foram analisadas 30 amostras de frutas e hortaliças minimamente processadas comercializadas em supermercados de Bauru e região. Todas as amostras analisadas apresentaram concordantes com a legislação vigente, no entanto a qualidade microbiológica das amostras de frutas foi superior a das hortaliças. Quanto às hortaliças, 93,3% das amostras analisadas se mostraram em acordo com a legislação vigente, sendo que uma delas (6,70%) apresentou contagem de coliformes termotolerantes acima do número estabelecido, além da presença de *Escherichia coli*. As amostras de frutas e hortaliças apresentaram contagens de coliformes totais elevadas, que são indicadores de falta de higiene e das Boas Práticas de Fabricação.

**Palavras-chave.** vegetais, processamento mínimo, coliformes, *Salmonella*.

### ABSTRACT

Aiming at assessing the microbiological quality of minimally processed foods based on the Brazilian Legislation, 30 samples of minimally processed fruits and vegetables were analyzed. These samples were collected from supermarkets in the Bauru region. All of the analyzed samples complied with the current legislation standards, although the fruit samples presented higher microbiological quality than vegetables. As for the vegetables, 93.3% of analysed samples presented compliance with the current legislation. Nonetheless, one of the samples (6.70%) showed higher thermotolerant coliform counts than those of the standards, and *Escherichia coli*, as well. Both fruits and vegetables samples showed high total coliform counts, indicating inadequacy on hygiene standards and manufacturing practices.

**Key words.** vegetables, minimally processed, coliforms, *Salmonella*.

## INTRODUÇÃO

A vida corrida da população em geral faz com que os consumidores procurem maior facilidade e qualidade na área alimentícia. Por isso, vem crescendo no mercado a procura por alimentos minimamente processados. Este método de processamento foi introduzido no Brasil na década de 1990 e emprega operações que eliminam suas partes não comumente consumidas como cascas, talos e sementes.

Estes vegetais passam por lavagem, descascamento, corte, sanitização, centrifugação, embalagem adequada e devem ser armazenados sob baixas temperaturas<sup>1</sup>. Tal processamento não altera significativamente as características nutricionais do produto, são práticos e passam à população uma imagem de segurança, durabilidade e qualidade<sup>2</sup>.

Segundo Cruz e colaboradores 2006<sup>3</sup>, a segurança microbiológica do produto minimamente processado passa, obrigatoriamente, pelas condições higiênico-sanitárias do pessoal, utensílios, equipamentos envolvidos no processamento, além da estrutura da instalação.

Todos os vegetais minimamente processados precisam ser rigorosamente selecionados, ou seja, frescos, colhidos no ponto ideal de maturação, sem manchas, cascas lisas e com cores homogêneas por todo o produto. Além da escolha adequada da matéria-prima, se não houver higiene, tanto dos manipuladores como do local e do equipamento envolvido neste processo, esses alimentos podem representar perigo para os consumidores<sup>2</sup>.

Frutas e hortaliças minimamente processadas apresentam metabolismo mais elevado que as inteiras, devido aos danos mecânicos causados pelas operações de corte e descascamento. A injúria causada pelo corte promove aumento na produção de etileno e na atividade respiratória, favorecendo assim a rápida deterioração do vegetal<sup>4</sup>.

A presença de células injuriadas e a perda de componentes celulares durante as operações de processamento propiciam ótimas condições para o desenvolvimento de micro-organismos. O tipo e a espécie, assim como o nível microbiano nos produtos minimamente processados variam de acordo com a fruta ou hortaliça, as práticas de cultivo, as condições higiênicas durante o manuseio e processamento, a temperatura de armazenamento, entre outros fatores<sup>5</sup>.

A RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>6</sup>, estabelece que os

alimentos minimamente processados tenham controle microbiológico através das pesquisas de *Salmonella* e coliformes termotolerantes.

Pesquisas realizadas com vegetais minimamente processados comercializados na cidade de Fortaleza e Porto Alegre detectaram amostras em desacordo com a legislação vigente<sup>2,7</sup>.

Para prevenir os riscos microbiológicos deve-se implantar o programa de Boas Práticas de Fabricação, estabelecido pela Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 da Anvisa<sup>8</sup>, que é um regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores e Industrializadores de Alimentos e a RDC 275 de 21 de outubro de 2002 da Anvisa<sup>9</sup> que preconiza os Procedimentos Operacionais Padrão.

Outro programa utilizado objetivando o controle de higiene e a qualidade dos produtos é o sistema Análise de Perigos e de Pontos Críticos de Controle (APPCC), recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que tem como objetivo a avaliação de todas as etapas envolvidas na produção de um alimento, desde a obtenção das matérias-primas até o uso pelo consumidor final<sup>10</sup>.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas comercializadas em supermercados da região de Bauru e verificar se os mesmos se encontravam em acordo com a RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001, da Anvisa.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ■ Material

Foram analisadas 30 amostras de produtos minimamente processados, adquiridas em 04 estabelecimentos comerciais da região de Bauru, sendo 15 de frutas e 15 de hortaliças. Todas as amostras foram transportadas sob refrigeração e analisadas imediatamente após a aquisição.

### ■ Métodos

As metodologias empregadas nas análises microbiológicas foram segundo Silva et al. (2001)<sup>11</sup>. Para a pesquisa de coliformes totais e termotolerantes foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP.g<sup>-1</sup>). A pesquisa de *Salmonella sp* foi conduzida em 25 g da amostra.

Este estudo apenas se concentrou nas análises indicadas na RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001, da Anvisa, assim não foram avaliadas as bactérias

pisicrotóficas e patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* que são passíveis de estarem presentes neste tipo de produto<sup>12,13</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ■ Frutas

Para as frutas minimamente processadas o padrão microbiológico estabelecido pela Portaria nº. 12 de 02 de janeiro de 2001 indica o máximo de 500 UFC.g<sup>-1</sup> para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* em 25g da amostra. Todas as amostras de frutas analisadas apresentaram-se em acordo com a legislação vigente.

Algumas amostras apresentaram contagens de coliformes totais igual ou maior que 1.100 NMP.g<sup>-1</sup> (Tabela 1). Isso pode ocorrer quando o estabelecimento processa matéria-prima de má qualidade e/ou não segue estratégias de qualidade sanitária, isto é, não segue o conjunto de medidas chamado Boas Práticas de Fabricação (BPF), o qual é considerado um dos programas mais importantes para se garantir a qualidade final de um produto.

A microbiota dos alimentos, em geral, é associada com os micro-organismos presentes no alimento cru ou

*in natura*, bem como aqueles contaminantes que ocorrem durante o manuseio, processamento e dos sobreviventes aos tratamentos de preservação, os quais permanecem durante o armazenamento dos produtos<sup>14</sup>.

Em frutas como melão, a microbiota bacteriana é favorecida devido à baixa acidez. No entanto, dentre as três amostras de melões analisadas, apenas uma apresentou níveis de coliformes acima de 1.100 NMP.g<sup>-1</sup>. Da mesma forma, kiwi e salada de frutas que apresentam acidez elevada apresentaram níveis elevados de coliformes. Este fato evidencia que o manuseio e o processamento foram os principais fatores para a maior contaminação desses produtos ácidos.

A amostra de coco seco apresentou suas características organolépticas alteradas, como cor, odor e consistência. Esse fato pode ter ocorrido pelo alto índice de coliformes totais encontrados nessa amostra, que possui ainda elevado teor de lipídios que podem facilmente se oxidarem devido à embalagem e temperatura de armazenamento inadequadas.

Pinheiro et al. (2005)<sup>2</sup> avaliaram a qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza e

**Tabela 1.** Resultados microbiológicos obtidos para as frutas analisadas

Amostras	Coliformes totais (NMP.g <sup>-1</sup> )	Coliformes termotolerantes (NMP. g <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i>
Abacaxi	< 3	< 3	Ausência em 25g
Coco seco 1	1.100	< 3	Ausência em 25g
Coco seco 2	> 1.100	210	Ausência em 25g
Goiaba Branca	93	< 3	Ausência em 25g
Goiaba Vermelha	240	< 3	Ausência em 25g
Kiwi	> 1.100	< 3	Ausência em 25g
Mamão papaya	7	< 3	Ausência em 25g
Melão 1	64	4	Ausência em 25g
Melão 2	> 1.100	< 3	Ausência em 25g
Melão caipira	240	240	Ausência em 25g
Melão Bahia fatiado	150	9	Ausência em 25g
Salada de fruta 1	1.100	3	Ausência em 25g
Salada de fruta 2	14	< 3	Ausência em 25g
Salada de fruta 3	1.100	< 3	Ausência em 25g
Salada de fruta 4	< 3	< 3	Ausência em 25g

\*NMP/g: Número Mais Provável por grama.

\*\* Composição da salada de fruta: maçã, banana, kiwi, melão e morango.



verificaram que 43% das amostras estavam impróprias para o consumo, segundo a RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001.

#### ■ Hortaliças

Entre as amostras analisadas 14 (93,3%) se mostraram em acordo com o padrão microbiológico estabelecido pela Portaria nº. 12, de 02 de janeiro de 2001, que estabelece o máximo de 100 UFC.g<sup>-1</sup> para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* em 25g da amostra.

Algumas amostras apresentaram contagens de coliformes totais igual ou maior que 1.100 NMP.g<sup>-1</sup> (Tabela 2), o que indica falta de cumprimento com as Boas Práticas de Fabricação.

Na amostra de couve, que corresponde a 6,7% do total, foi constatada a presença de coliformes termotolerantes acima do permitido, sendo confirmada a presença de *Escherichia coli*.

Santos et al. (2005)<sup>15</sup> analisaram 30 amostras de alface, cenoura e couve minimamente processadas comercializadas em Brasília – DF. Os autores verificaram a presença de coliformes a 45°C acima do permitido em

todas as amostras analisadas e foi observada a presença de *Salmonella* sp. em uma das amostras de alface.

Silva et al. (2007)<sup>7</sup> avaliaram 56 amostras de vegetais minimamente processados comercializados na cidade de Porto Alegre-RS e confirmaram a presença de *Escherichia coli* em oito amostras.

De acordo com a International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSF<sup>16</sup>, a presença de coliformes em alimentos indica manipulação inadequada durante o processamento, uso de equipamentos em más condições sanitárias ou ainda utilização de matéria-prima contaminada.

#### CONCLUSÃO

Procedimentos operacionais inadequados levam a um incremento no crescimento microbiano, o qual compromete a qualidade e segurança dos produtos minimamente processados.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que há necessidade de maior controle de qualidade desde a aquisição da matéria-prima até o produto

**Tabela 2.** Resultados microbiológicos obtidos para as hortaliças analisadas

Amostras	Coliformes totais (NMP.g <sup>-1</sup> )	Coliformes termotolerantes (NMP. g <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i>
Acelga	240	< 3	Ausência 25g
Almeirão	1.100	< 3	Ausência 25g
Beterraba em fios	1.100	< 3	Ausência 25g
Cenoura em tiras	>1.100	< 3	Ausência 25g
Cenoura fatiada	210	< 3	Ausência 25g
Cenoura em fios	28	< 3	Ausência 25g
Cenoura ralada	23	< 3	Ausência 25g
Chicória 1	1.100	< 3	Ausência 25g
Chicória 2	1.100	< 3	Ausência 25g
Couve 1	240	240 E. coli	Ausência 25g
Couve 2	3	< 3	Ausência 25g
Quiabo	1.100	< 3	Ausência 25g
Repolho	9	< 3	Ausência 25g
Salsa e cebolinha	93	< 3	Ausência 25g
Vagem	1.100	< 3	Ausência 25g

\*NMP/g: Número Mais Provável por grama.

final, adotando-se rigorosamente as Boas Práticas de Fabricação. Sugere-se também a implementação de um sistema efetivo de controle, por meio de programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), de forma a garantir um produto saudável e seguro para o consumidor.

---

#### AGRADECIMENTO

À Fundação Veritas, pelo apoio financeiro o qual possibilitou a execução deste projeto.

---

#### REFERÊNCIAS

- Oetterer M, Regiano-d'arce MAB, Spoto MHF. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos, Ind. São Paulo: Manole; 2006.
- Pinheiro NM, Figueiredo ATF, Figueiredo RW, Maia FA, Souza PHM. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Rev. Brás. Frutic.* 2005; 27(1): 153-6.
- Cruz AG, Cenci AS, Maia MCA. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26(1): 104-9.
- Wiley RC. Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. New York: Chapman & Hall, 1994.368p.
- Artés F, Gómez P A, Artés-Hernández F. Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. *Food Sci Tech Int.* 2007; 13(3):177-88.
- Brasil. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.
- Silva SRP, Verdin SEF, Pereira DC, Schatkoski AM, Rott MB, Corção G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38: 594-8.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS). Portaria nº 326 de 30 de julho de 1997. Dispõe sobre o Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 01 de ago. 1997.
- Brasil. Resolução - RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 06 de nov. 2002.
- CODEX Alimentarius. Normas Alimentarias FAO/OMS. Código de práticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas. CAC/RCP 53-2003. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2nd ed. São Paulo: Livraria Varela; 2001.
- Froder R, Martins R, Souza KLO, Landgraf M, Franco BD, Destro M. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. *Journal of Food Protection.* 2007; 70: 1277-80.
- Collin H, Cotter PD, Sleator RD, Gahan CGM. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal.* 2002; 12:273-83.
- Chitarra MIF, Chitarra, AB. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2nd ed. Lavras (UFPA); 2005.
- Santos APR, Junqueira AMR, Resende A. Avaliação da contaminação microbiológica em hortaliças minimamente processadas. *Revista da Sociedade Brasileira de Horticultura.* 2005; 23:439-41.
- International commission on microbiological specifications for foods. *Microorganisms in foods.* 2nd ed. Toronto: University of Toronto Press; 1978.

## Comparação entre os métodos de Lane-Eynon e polarimétrico para determinação de amido em farinha de mandioca

The Lane-Eynon technique and the polarimetric assay performance for determining starch in manioc

RIALA6/1204

Fabíola Lopes Caetano MACHADO<sup>1</sup>, Gisélia CAMPOS<sup>2\*</sup>, Mariana Temponi Godinho SOUZA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: Av. Amazonas, nº 4080, sl 203, Bairro Barroca, Belo Horizonte, MG, Brasil, CEP 30480-000, e-mail: giseliacampos@oi.com.br; mtemponi@gmail.com

<sup>1</sup>Rede Metrológica de Minas Gerais, MG, Brasil.

<sup>2</sup>NUGAP – Núcleo Global de Análise e Pesquisa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Biomedicina da Unifenas de Belo Horizonte, MG, Brasil.

Recebido: 22.08.2008 – Aceito para publicação: 08.04.2009

### RESUMO

Foram analisadas amostras de farinha de mandioca por meio das técnicas de Lane-Eynon e de polarimetria para determinação de amido, a fim de avaliar o desempenho de ambas as metodologias. Foi utilizado o teste de Student para comparar os resultados obtidos por meio dessas duas técnicas e foram calculados os valores da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação dos resultados obtidos de análises realizadas em replicata. Não houve diferença significativa entre os dois ensaios em nível de 5%. As duas técnicas mostraram-se precisas e exatas, porém requerem técnicos adequadamente treinados. A técnica polarimétrica apresenta vantagens por ser de execução mais rápida e de menor custo. A técnica de Lane Eynon pode ser empregada como ensaio alternativo, conforme a disponibilidade tecnológica do laboratório.

**Palavras-chave.** farinha de mandioca. amido. Lane-Eynon. ensaio polarimétrico.

### ABSTRACT

The Lane Eynon and polarimetric techniques performance were assessed in determining starch in manioc flour samples. The Student's t-test was used to compare both methodologies and to calculate the average, the standard deviation and the coefficient of variation of the results obtained from replicate assays. No significant differences were shown between both methodologies at 5% level. Both techniques proved to be accurate, although highly trained technicians are required. Nevertheless, the use of polarimetric methodology showed advantages because it is faster and easy to perform, and of low cost. The Lane Eynon technique might be employed as an alternative assay, according to the laboratory conditions availability.

**Key words.** manioc flour, starch, Lane-Eynon, polarimetry.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mandioca, tendo produzido 25,4 milhões de toneladas em 1995, numa área cultivada de 1,96 milhões de hectares<sup>1</sup>.

De acordo com estudos de Cereda<sup>2</sup>, a mandioca é uma raiz eminentemente calórica, sendo o amido o principal carboidrato. Esta apresenta, em média, 62,0% de umidade, 1,3 % de fibras, 34,0% de carboidratos e 1,1% de cinzas.

Dentre os muitos subprodutos obtidos da mandioca, a farinha é considerada o principal produto processado, absorvendo cerca de 70 a 80% da produção mundial da raiz<sup>3</sup>. Ele é destinado em grande parte ao comércio interno, não apresentando valor relevante como produto de exportação<sup>4</sup>.

A farinha de mandioca é o produto obtido pela ligeira torração da raladura das raízes de mandioca previamente descascadas, lavadas e isentas do radical cianeto. O produto submetido à nova torração é denominado farinha de mandioca torrada.

Segundo a Portaria nº. 554, de 30 de agosto de 1995/Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>5</sup> a Farinha de Mandioca seca é classificada nos subgrupos Fina Beneficiada, Extra Fina, Fina, Grossa, Média, Bijusada, sendo, em cada subgrupo, os tipos 1, 2 e 3, considerando os seus aspectos físicos e químicos, dentre estes, os teores de amido, umidade, acidez e cinzas.

O método de Lane-Eynon é muito aplicado em farinha de trigo, mandioca ou amostras que contenham alto teor de amido. Este é um método titulométrico baseado na hidrólise completa do amido até glicose, que reduz o cobre do reagente de Fehling a óxido de cobre<sup>6</sup>, porém o método mais recomendado para sua determinação é o da polarimetria<sup>7,8</sup>. Seu fundamento está no valor do desvio da luz polarizada ao atravessar uma quantidade já determinada de uma solução opticamente ativa<sup>9</sup>. Neste caso, realiza-se a hidrólise branda do amido com solução de HCl 0,31M.

O objetivo deste trabalho foi comparar os resultados obtidos na determinação de amido por dois métodos oficiais<sup>10</sup>, considerando-se que o de Lane-Eynon é muito utilizado e o da polarimetria é o indicado pelo Ministério da Agricultura por ser o recomendado pela Comunidade Econômica Europeia (EEC). Os resultados obtidos possibilitariam os laboratórios de análise de alimentos a uma alternativa metodológica, sem prejuízo da exatidão e precisão dos resultados, levando também em consideração,

a limitação de custo do método Polarimétrico, pois o preço de um polarímetro varia de, aproximadamente, R\$ 3.000,00 a R\$ 50.000,00.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ■ Amostragem

Para o teste de repetibilidade, foram utilizadas amostras de uma farinha de mandioca fina tipo 2 adquirida no comércio, em Belo Horizonte/MG, denominadas de A e B para o método polarimétrico e C para o método de Lane Eynon. Para os testes de recuperação, amostra D, e também, amido padrão marca Synth, com teor de 0,4% de cinzas e 8% de umidade.

Para a comparação dos resultados entre os dois métodos, foram utilizadas nove amostras de farinha de mandioca, analisadas pelo método polarimétrico, no Laboratório CLAPAR/Maringá, codificadas e enviadas ao laboratório NUGAP/MG.

## MÉTODOS

### ■ Polarimetria

O preparo da amostra consistiu em homogeneizar e passar por tamis 16 Tyler/Mesh. Para a determinação da rotação óptica total (PR) pesou-se 2,5g para a digestão com HCl 0,31N em banho-maria fervente. Em seguida foi feito o resfriamento, adição de água deionizada e a adição dos clarificantes. Após o ajuste do volume com água deionizada, foi realizada filtração e leitura a 20 °C no polarímetro, usando água deionizada como branco. Para eliminar interferência de outras substâncias como glicídios redutores e não redutores, caso presentes, determinou-se a rotação óptica de substâncias solúveis em etanol (PB), da seguinte forma: pesou-se 5 g da amostra para balão volumétrico de 100mL, diluindo-se com etanol 40%. Pipetou-se 50 mL desta solução e procedeu-se à digestão com 2,1 mL de HCl 25%, em banho-maria com refluxo, seguindo-se o procedimento descrito acima, a partir do resfriamento no preparo da amostra.<sup>11</sup>

Para os estudos preliminares, foi utilizada uma amostra de farinha de mandioca adquirida no comércio em Belo Horizonte, analisada inicialmente em 10 (dez) repetições para padronização do procedimento. Posteriormente analisou-se outra amostra em 8 (oito) repetições. Foi utilizado o Polarímetro Polax WXG4 do laboratório da Unifenas de Belo Horizonte/MG.

Para a comparação dos resultados obtidos pelos métodos polarimétrico e de Lane Eynon, a análise polarimétrica foi realizada no Laboratório CLASPAR/Maringá, credenciado pelo MAPA para análises físicas e químicas de produtos derivados da mandioca, utilizando polarímetro marca Atago, modelo PX 552.

O teor de amido na amostra foi obtido aplicando-se a fórmula:

$$\% \text{ amido} = \frac{2000 \times (\text{PR} - \text{PB})}{[\text{J}]_I^{20}}$$

Onde:

$[\text{J}]_I^{20} = 184,8$  (específico da farinha de mandioca);  
PB=Prova Branco; PR= Prova Real;

Fator 2000 = 100 (conversão do resultado em %) x 40 (foi tomado 2,5g da amostra) / 2 (o comprimento do tubo em dm)

#### ■ Lane Eynon

O método de Lane-Eynon é um método oficial, mais acessível e usado rotineiramente, como demonstrado no trabalho de controle interlaboratorial Interlab XV, realizado pela CIENTEC, onde, de 42 laboratórios envolvidos no projeto, 39 determinaram o teor de amido por este método. As análises foram realizadas no laboratório NUGAP/BH, conforme procedimento operacional deste laboratório:

Pesou-se 2g da amostra tamisada em tamis 32 Tyler/Mesh, adicionou-se cerca de 80mL de água deionizada, procedendo-se ao aquecimento até fervura. Adicionou-se 15 mL de HCl 37% mantendo o aquecimento por uma hora e meia a aproximadamente 100 °C, com refluxo. Em seguida foi feita a neutralização com NaOH, a transferência para um balão de 250 mL, a clarificação com acetato de zinco 1M e ferrocianeto de potássio 0,25 M. Completou-se o volume com água deionizada e realizou-se a filtração.<sup>10,11,12</sup>

Para realizar os cálculos, utilizou-se o fator da solução de Fehling, determinado por uma solução de glicose a 1%. O resultado foi convertido em g de amido por 100g de amostra, ao ser multiplicado pelo fator de conversão 0,9.

#### ■ Processo de coleta e análise de dados (Delineamento experimental)

Para o estudo da precisão do método polarimétrico<sup>13</sup> foram realizadas dez repetições, denominada amostra A e

oito repetições, denominada amostra B. Para o método de Lane Eynon foram realizadas seis repetições, amostra C.

Na comparação dos métodos, polarimétrico e Lane-Eynon, utilizou-se a técnica de pareamento. A equivalência dos resultados foi avaliada pelo teste-T de Student Pareado testando-se a hipótese  $H_0: \bar{d} = 0$ . Sendo  $d_i = x_i - y_i$  conforme tabela 1. Os métodos são considerados estatisticamente iguais se a diferença média dos pares de resultados  $\bar{d}$  for estatisticamente igual a zero.

Para os testes de recuperação, foram analisadas amostras de amido padrão marca Synth, com teor de 0,4% de cinzas e 8% de umidade em triplicata, amostras de farinha de mandioca (amostra D) em cinco repetições e amostras de farinha preparadas, nas quais foram substituídos 10% do peso utilizado na análise, pela mesma quantidade de amido padrão, em seis repetições para cada método, sabendo-se que o peso total da amostra para o método de Lane-Eynon e Polarimetria, são 2,00g e 2,50g, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como estudo preliminar, foi analisada uma amostra de farinha de mandioca fina tipo 2 por polarimetria em dez repetições. Esta amostra foi analisada no Laboratório Clasper de Maringá, também por polarimetria, e apresentou um resultado de 86,96% de amido referente à amostra A, portanto bem mais alto que a média de 69,12% dos resultados encontrados no laboratório da Unifenas de Belo Horizonte/MG. Verificou-se então a necessidade de uma melhor padronização do método, com ênfase na importância da temperatura do banho-maria, do tempo e da agitação, formando uma massa homogênea de amostra, na fase da hidrólise. As modificações foram introduzidas conforme orientação do Laboratório da CLASPAR<sup>14</sup> e realizadas novas análises, em oito repetições, atingindo uma média de 84,97%.

Para o método Polarimétrico foi observado neste trabalho e confirmado pela CLASPAR<sup>14</sup>, que para a farinha de mandioca a leitura do PB foi menor que o limite de detecção do polarímetro WXG-a, ou seja, menor que 0,05%, indicando a ausência de substâncias solúveis em etanol, neste produto. O limite de detecção do método não foi determinado, pois não se trata de quantidade traço.<sup>14</sup>

A amostra A, com média de 69,12% e desvio padrão de 0,83, possui coeficiente de variação igual a 0,01%; já a B, 84,97%, 0,83 e 0,0097%; e a C 81,17%, 1,77 e 0,02%, respectivamente.



Os testes de repetibilidade objetivaram reduzir índice de erros, amenizar falhas técnicas e aperfeiçoar o manipulador. Após realização destes, foram realizadas as análises que levaram à conclusão deste estudo, o qual é comentado a seguir:

Analisando os resultados da Tabela 1, por meio do teste-T Pareado, aceita-se  $H_0$ , ou seja, não existe diferença significativa entre os métodos a um nível de significância de 0,05, uma vez que, o valor de  $t$  calculado ( $gl=8; 95\%$ ) = 1,52 é inferior ao  $t$  crítico ( $bicaudal, gl=8, 95\%$ ) = 2,31, onde,  $gl$  é graus de liberdade.

Para os testes de recuperação, foram realizadas análises referentes ao teor de amido do amido padrão da marca Synth no Laboratório da Unifenas/BH pelo método polarimétrico. O resultado foi de 85,50% correspondendo a 93,33% de recuperação. Para a amostra de farinha D, o teor médio encontrado foi de 82,79% e o da farinha preparada foi de 84,32%, o que corresponde a 102,06% de recuperação.

Já para o método de Fehling, cujas análises foram realizadas no Laboratório NUGAP/BH, o teor de amido do amido padrão foi de 88,66% correspondendo a 96,78% de recuperação. Para a amostra de farinha D, o teor médio encontrado foi de 82,12% e o da farinha preparada foi de 82,20%, o que corresponde a 99,21% de recuperação.

Aplicando o teste-T entre médias com variâncias diferentes concluiu-se que não houve diferença significativa entre as médias dos valores de recuperação encontrados

pelos dois métodos, a um nível de significância de 0,05. Pelo teste F percebe-se que existe diferença significativa entre as variâncias dos resultados de recuperação encontrados pelos dois métodos sugerindo que há uma variabilidade maior para os valores encontrados pelo método de Lane-Eynon.

## CONCLUSÃO

Pelo resultado do teste de comparação pareada conclui-se que não há diferença significativa dos resultados obtidos pelos dois métodos em questão ao nível de 5%.

Tanto o método polarimétrico quanto o de Lane-Eynon, demonstraram ser precisos, mas exigem um treinamento adequado do técnico. O método polarimétrico apresentou a vantagem de ser mais rápido, mais econômico relativo a uso de reagentes, podendo ser realizado em polarímetro simples de custo acessível. Concluímos que o laboratório deve adotar preferencialmente o método polarimétrico e utilizar o método de Lane-Eynon como alternativo.

## AGRADECIMENTOS

À tradutora Carolina T. Costa, ao laboratório CLASPAR, Maringá, ao laboratório da Unifenas de Belo Horizonte, MG e a Ana Paula L Mota.

**Tabela 1.** Resultados da determinação do teor de amido em farinha de mandioca pelos métodos polarimétrico e Lane-Eynon, e comparação dos mesmos

Amostra Farinha de mandioca	Método de Lane-Eynon (lab. NUGAP) - $x_i$ (%)	Método Polarimétrico (lab. Claspar) - $y_i$ (%)	$d_i$
849	84,25	82,61	1,64
851	80,73	82,61	-1,88
852	73,36	69,57	3,79
858	84,32	83,70	0,62
859	82,17	83,70	-1,53
864	88,69	83,70	4,99
865	88,29	86,96	1,33
866	82,37	82,61	-0,24
868	79,82	78,26	1,56

## REFERÊNCIAS

1. Silva JR, Vegro CLR, Assunção R, Pontarelli CTG. A agroindústria de farinha de mandioca nos estados de São Paulo e do Paraná, 1995. Informações econômicas, São Paulo; 1996, 26(3): 69-83
2. Cereda MP, Daiuto ER, Vilpoux O. Metodologia de determinação de amido digestão ácida em microondas; Rev. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca; Série on-line 2004 2(8) Disponível em: <http://www.abam.com.br/revista/revista8/metodologia.php> [Citado 2008, setembro]
3. Chuzel G, Zakhia N, Cereda MP. Potencialités de nouveaux produits dérivés du manioc au Brésil. 2002. In: EGBE, T. A.; Brauman, A.; Griffon, D.; Treche, S. (Eds.). Transformation alimentaire Du manioc. Paris: Orstom; 1995. p. 63-74.
4. Câmara GMS, Godoy OP, Marcos Filho J, Lima UA. Mandioca: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo; 1982.
5. Brasil. Portaria nº554 de 1995 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 ago. 1995, Seção 1, nº554, p. 13515.
6. Carvalho GGP, Fernandes FEP, Pires AJV. Métodos para determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais. Revista Eletrônica de Veterinária REDVEST, v.2, n.1, 2006. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010106/010604.pdf>
7. Balch RT. Rapid determination of starch (root) with sodium hypochlorite; Ind. Eng. Chem., Anal. 13 ed; 1941. p. 246-8.
8. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos. 2ed. São Paulo, SP, IMESP, 1976, p. 44-8.
9. GOLD LAB Artigos para Laboratório. Manual de instruções: Polarímetro WYG4. Ribeirão Preto, SP; 2007.
10. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed., P Cunniff. Arlington, Virginia, USA; 1995.
11. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.1018pp.
12. NUGAP Núcleo Global de Análise e Pesquisa Ltda. POP Determinação de amido por volumetria. FQ 010, 2ª revisão. Belo Horizonte, MG; 2008.
13. INMETRO DOQ-CGCRE-008 Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Rio de Janeiro. Brasil. 2002.
14. CLASPAR Empresa Paranaense de Classificação de Produtos. POP Determinação de Amido. 2ª revisão. Maringá, PR; 2007.

## Instabilidade oxidativa do óleo de soja submetido à fritura de alimentos congelados

---

Tanamati, AAC. **Oxidative instability of soybean oil submitted to the frying of frozen foods.** Maringá, Paraná, 2008 [Tese de Doutorado – Área de concentração: Química Universidade Estadual de Maringá – UEM Paraná]. Orientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer.

---

O presente estudo teve como objetivo avaliar o estado de degradação do óleo de soja refinado (OSR), utilizado em cinco processos domésticos de fritura, onde foram fritos separadamente, empanados de frango (EF), hambúrguer bovino (HB), hambúrguer de peixe (HP), mandioca palito (MP) e batata palito (BP). Foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os valores da composição centesimal descrita nos rótulos e determinadas experimentalmente para alguns produtos estudados. As reações de hidrólise, nos óleos de fritura, foram acompanhadas pelo aumento do índice de acidez (IA), atingindo 0,51 mg KOH/g. As reações termooxidativas, nos óleos de fritura, foram monitoradas por meio de índice de acidez (IP) com o máximo de 13,81 meq  $O_2$ /kg, determinação da extinção específica ( $\dot{A}_{1cm}^{\%}$ ) a 232 nm e 270 nm, alcançando 13,76% e 5,72%, respectivamente. O teor de compostos polares totais (CPT) foi determinado utilizando de cromatografia clássica em coluna (CC) e o instrumento analisador Testo 265, atingindo 11,23 e 22,5%, respectivamente, com correlação desejável entre os dois métodos. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) foram separados por cromatografia a gás (CG), identificados a partir dos valores do comprimento equivalente da cadeia (CEC), obtidos pelo uso da coluna Carbowax 20M, com isoterma de 200°C e comparação com tempo de retenção de padrões e valores da literatura. A quantificação dos ácidos graxos (AG), dos produtos e dos óleos de fritura, foi realizada utilizando o tricosenoato de metila (23:0), como padrão interno. A verificação da otimização do detector de ionização de chama (DIC) foi avaliada pelos fatores de resposta de ácidos graxos saturados e insaturados. Após análise comparativa, entre o fator de correção experimental (FCE) e o fator de correção teórico (FCT), os resultados indicaram o uso do FCT dos EMAGs para expressão da concentração em massa dos AG, com maior precisão. Apenas na mandioca *in natura* não foi verificada a presença de ácidos graxos *trans* (AGT). A transferência lipídica alterou a composição em AG, provocando acréscimo de AGT nos óleo de fritura e incorporação nos produtos fritos. Dentre os produtos fritos a maior quantidade de AGT foi encontrada na BP (545,06 mg/100 g). A concentração de AGT nos óleos de fritura variou de 9,25 a 29,00 mg/g de óleo. Ocorreu aumento, dos AGT e a redução de AG essenciais, com diferença significativa ( $P < 0,05$ ), no óleo com o número de aquecimento, mesmo na ausência de qualquer alimento. Foi confirmada, por espectrofotometria no infravermelho, a presença de AGT na BP e seus respectivos óleos de fritura. De maneira geral, os resultados indicaram a transferência de AG entre o óleo de fritura e os alimentos, geração de AGT durante as frituras e alterações negativas dos diversos parâmetros físico-químicos analisados. Desta forma, recomenda-se aos consumidores, evitar a reutilização de óleos vegetais de soja nos processos de fritura.

Tese disponível na  
Biblioteca da Universidade Estadual de Maringá  
E-mail: aactanamati@utfpr.edu.br

## INSTRUÇÃO AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) iniciada em 1941 é uma publicação trimestral com o objetivo de publicar e divulgar resultados de investigações científicas básicas, tecnológicas, laboratoriais e aplicadas, relacionadas às ações de promoção, prevenção de agravos e doenças, abrangendo as diversas áreas de interesse em saúde pública.

Publica artigos de pesquisa original, artigos de revisão, comunicações breves, notas científicas, relatos de casos, resumos de teses e dissertações.

1. **MISSÃO:** Editado nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem o objetivo de divulgar textos científicos relacionados às diversas áreas de atividades laboratoriais em saúde pública, de maneira rápida e precisa. Além de disseminar informações entre os profissionais das áreas biomédicas e bromatológicas, a RIAL propõe o incentivo à produção de artigos científicos desenvolvidos na prática da investigação científica nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária. Nesse sentido, proporciona a atualização e, conseqüentemente, o aprimoramento dos profissionais que atuam na prevenção e controle de agravos à saúde no âmbito nacional e internacional.
2. **ARBITRAGEM:** Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem atender às instruções aos autores, que seguem as diretrizes dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos, editados pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (Committee of Medical Journals Editors – Grupo de Vancouver), disponíveis em: <http://www.icmje.org/>.
3. **PROCESSO DE REVISÃO:** Todos os textos publicados na RIAL passam por processo de revisão por especialistas. Os editores fazem uma revisão inicial para avaliar se os autores atenderam aos padrões da RIAL, bem como ao atendimento das normas para o envio dos originais. Em seguida o artigo é encaminhado a dois pareceristas da área pertinente, sempre de instituições distintas daquela de origem do artigo, e cegos quanto à identidade e vínculo institucional dos autores. 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 pareceristas.
4. **TIPOS DE ARTIGO:** A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) recebe textos científicos nas seguintes modalidades:
5. **ARTIGOS ORIGINAIS:** Apresentam resultados originais provenientes de estudos sobre quaisquer aspectos da prevenção e controle de agravos e de promoção à saúde, desde que no escopo da saúde pública. Esses artigos devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para a saúde pública.

Destinados à divulgação de resultados de pesquisa original inédita, que possam ser replicados e/ou generalizados. Devem ter no máximo 20 laudas impressas, incluindo 20 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos) e 40 referências. Resumo em Português e em Inglês (Abstract), com no máximo 200 palavras, e entre 3 e 6 palavras-chave (key words). Pode apresentar também, um Resumo Expandido em inglês e neste caso pode ter no máximo 22 laudas impressas.

6. **REVISÕES:** Elaboradas por especialista convidado pelo corpo editorial. Deve constar de uma avaliação crítica sistematizada da literatura sobre assunto relevante à saúde pública. Devem ser descritos os procedimentos adotados, esclarecendo a delimitação e limites do tema. Extensão máxima: 15 laudas impressas, incluindo Resumo (Abstract) de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave (key words); 30 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 80 referências.
7. **COMUNICAÇÕES BREVES:** São artigos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa. No máximo 10 laudas impressas, incluindo Resumo de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave; 2 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 15 referências.
8. **NOTAS CIENTÍFICAS:** São textos que têm por objetivo apresentar ocorrências relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais desta pesquisa para uma rápida divulgação. No máximo 06 laudas impressas, incluindo Resumo de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave; 2 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 10 referências.
9. **RELATOS DE CASOS:** 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. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anatômicos e fisiológicos. No máximo 03 laudas impressas incluindo Resumo de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave; 2 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 10 referências.
10. **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES:** Serão aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Devem conter os nomes do autor e do orientador, título do trabalho (em Português e Inglês), nome da instituição em que foi apresentado e ano de defesa. No máximo 400 palavras e entre 3 e 6 palavras-chave.

11. **APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS:** Ao manuscrito deverá ser anexada uma carta de apresentação, assinada por todos os autores, dirigida ao Corpo Editorial da RIAL. Nela deverão constar as seguintes informações: o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico; nenhum autor tem vínculos comerciais que possam representar conflito de interesses com o trabalho desenvolvido; todos os autores participaram da elaboração do seu conteúdo (elaboração e execução, redação ou revisão crítica, aprovação da versão final).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Nesse sentido, os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi concluída de acordo com os padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmoelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico deverão ser colocados ao final do RESUMO. Assim como, os ensaios envolvendo animais deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6638-1976 e a Lei 11.794-2008 que normatiza a utilização de animais em pesquisas científicas – conhecida como Lei Arouca.

O texto deverá ser redigido em português ou em inglês (Resumos Expandidos exclusivamente em inglês), com entrelinhamento duplo. O manuscrito deve ser encaminhando em formato eletrônico (e-mail, disquete ou CD-ROM) ou impresso (folha A4), aos cuidados do editor da RIAL, no seguinte endereço: Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) - Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz Setor de Publicações - Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – São Paulo - SP – Brasil CEP: 01246-902 ou por meio eletrônico: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

12. **A ESTRUTURA DOS TEXTOS:** O manuscrito deverá ser apresentado segundo a estrutura das normas de Vancouver: Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Metodologia; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.
13. **PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO:** Título do artigo, conciso e completo, em português e inglês; nome completo de todos os autores; indicação da instituição à qual cada autor está afiliado (Laboratório, Setor, Seção, Serviço, Divisão, Departamento, Instituto, Faculdade e Universidade); indicação de um autor responsável pela troca de correspondência; se subvencionado, indicar nome da agência de fomento que concedeu o auxílio e respectivo nome do processo; se foi extraído de dissertação ou tese, indicar título, ano e instituição em que foi apresentada.
14. **RESUMO:** Todos os textos deverão ter resumo em português e em inglês (Abstract), dimensionado entre 200 palavras. Para os artigos originais, o resumo deve destacar os propósitos do estudo, procedimentos básicos adotados (seleção de sujeitos de estudo ou animais de laboratório, métodos analíticos e observacionais), principais descobertas e conclusões. Devem ser enfatizados novos e importantes aspectos do estudo ou das observações. Uma vez que o resumo é a principal parte indexada do artigo em muitos bancos de dados eletrônicos, e a única parte que alguns leitores lêem, os autores precisam lembrar que eles devem refletir, cuidadosamente, o conteúdo do artigo. Para os demais textos, o resumo deve ser narrativo, mas com as mesmas informações.
15. **DESCRIPTORIOS (UNITERMOS OU PALAVRAS-CHAVE):** Seguindo-se ao resumo, devem ser indicados no mínimo três e no máximo dez descritores do conteúdo, que têm por objetivo facilitar indexações cruzadas dos textos e podem ser publicados juntamente com o resumo. Em português, os descritores deverão ser extraídos do vocabulário “Descritores em Ciências em Saúde” (DeCS), da Bireme (disponível em [www.bireme.br](http://www.bireme.br)). Em inglês, do “Medical Subject Headings” (Mesh). Caso não sejam encontrados descritores adequados à temática abordada, termos ou expressões de uso corrente poderão ser empregados.
16. **INTRODUÇÃO:** Contextualiza o estudo, a natureza dos problemas tratados e sua significância. A introdução deve ser curta, definir o problema estudado, sintetizar sua importância e destacar as lacunas do conhecimento abordadas.
17. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A metodologia deve incluir apenas informação disponível no momento em que foi escrito o plano ou protocolo do estudo; toda a informação obtida durante a condução do estudo pertence ao item Resultados. Deve conter descrição, clara e sucinta, acompanhada da respectiva citação bibliográfica, dos procedimentos adotados, a população estudada (universo e amostra), instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação e método estatístico.
18. **RESULTADOS:** Devem ser apresentados em seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, colocando as descobertas principais ou mais importantes primeiro. Os resultados encontrados devem ser descritos – sem incluir interpretações e/ou comparações. Sempre que possível, devem ser apresentados em tabelas e figuras auto-explicativas e com análise estatística, evitando-se sua repetição no texto.
19. **DISCUSSÃO:** Deve enfatizar os novos e importantes aspectos do estudo e as conclusões que dele derivam. Deve ser apresentada as considerações das limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e da interpretação dos autores, e quando for o caso, novas hipóteses.
20. **CONCLUSÃO:** Traz as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho e formas de continuidade. Se tais aspectos já estiverem incluídos na discussão, a conclusão não deve ser escrita.
21. **AGRADECIMENTOS:** Deve-se limitar ao mínimo possível, sempre ao final do texto.



**22. CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS**

A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

Ao longo do artigo, o número de cada referência deve corresponder ao número sobrescrito, imediatamente após a respectiva citação. Devem ser numeradas consecutivamente.

Exemplo: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06<sup>1</sup>, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>.

23. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** Listadas ao final do texto, devem ser numeradas de acordo com a ordem de citação. A quantidade de referências deve ser respeitada conforme definido em cada tipo de artigo aceito pela Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL).

**24. ORIENTAÇÕES GERAIS:**

Os autores (pessoa física) devem ser referenciados pelo seu sobrenome (apenas a letra inicial colocada em maiúscula), seguido das iniciais do nome, sem ponto.

Quando o documento consultado possui até seis autores, citam-se todos os nomes, separados por vírgulas. Mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão em Latim “*et al*”.

Indicar as organizações quando estas assumem a autoria do documento. Se for mais de uma organização, devem ser separadas por ponto-e-vírgula. Para identificar a hierarquia dentro da organização, separar por vírgula.

Quando o documento é de autoria de pessoas físicas e organizações, os nomes devem ser separados por ponto-e-vírgula, de acordo com a hierarquia.

Quando o documento consultado não possui autoria, iniciar a referência bibliográfica pelo título.

A primeira letra do título deve ser grafada em maiúscula.

25. **ARTIGOS DE PERIÓDICOS:** As referências devem ser iniciadas pelo nome do autor, seguido dos títulos do artigo e do periódico, separados por ponto final, respectivamente. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme lista do *Index Medicus* (base de dados Medline), disponível no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>.

Após o título do periódico, coloca-se um ponto final, seguido da data de publicação; volume (número): página inicial-final. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

Exemplos:

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.

26. **LIVROS:** Na citação de livros deve constar a cidade de publicação, opcionalmente, a sigla do Estado ou província pode ser acrescentada, assim como o país, por extenso, entre parênteses; exemplos: São Paulo (SP) e São Paulo (Brasil). Quando se tratar da primeira edição, não é necessário indicar. A abreviação do número da edição seguirá a norma da língua portuguesa; exemplo: 4ª ed.

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

27. **CAPÍTULOS DE LIVRO:** Para referenciar capítulos de livros, os autores deverão seguir o exemplo:

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

Arnau JM, Laporte JR. Promoção do uso racional de medicamentos e preparação de guias farmacológicos. In: Laporte JR, Tognoni G, Rozenfeld S. Epidemiologia do medicamento: princípios gerais. São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco; 1989.

28. **DISSERTAÇÕES, TESES E MONOGRAFIAS:**

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra. [dissertação de mestrado]. Bananeiras, Paraíba: 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:Universidade de São Paulo; 2006.
- 29 **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].
30. **PERIÓDICOS E DADOS ELETRÔNICOS:**  
Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso em 17 de setembro de 2008.]. Disponível em: [<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc>].  
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. [base de dados na internet] Tabelas de Resultados: Tabela 1.1.20 – População recenseada e estimada, segundo os municípios – São Paulo 2007. Disponível em: [<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/defaulttab.shtm>].  
**Legislação:** Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dão outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 266-9, 26 de mar. 2004, Seção 1.
31. **AUTORIA INSTITUCIONAL:**  
Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.1018pp.  
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).  
Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (*Grupo Vancouver*), disponível <http://www.cmje.org>.
32. **TABELAS:** Devem ser apresentadas em folhas ou arquivo separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto. A cada uma deve ser atribuído um título breve. Notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé. A quantidade de tabelas deve ser respeitada conforme definido em cada tipo de artigo aceito pela Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL).
33. **QUADROS:** São identificados como tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.
34. **FIGURAS:** Fotografias, desenhos, gráficos etc., citados como figuras, devem ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram mencionados no texto. As legendas devem ser apresentadas em folha à parte; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução. A quantidade de figuras deve ser respeitada conforme definido em cada tipo de artigo aceito pela Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL).
35. **ORIENTAÇÕES GERAIS:** Tabelas, ilustrações e outros elementos gráficos devem ser nítidos e legíveis, em alta resolução. Se não for de própria autoria, mencionar a fonte e anexar a permissão para reprodução. O número de elementos gráficos está limitado ao definido em cada tipo de artigo aceito pela RIAL. Abreviaturas devem ser explicitadas por extenso, quando citadas pela primeira vez.