

ISSN (*on-line*) 1984-235X

Boletim do Instituto Adolfo Lutz

Bol Inst Adolfo Lutz. 2014: ano 24, n. 1, p.1-59



Boletim do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Bol Inst Adolfo Lutz. 2014: ano 24, n. 1, p.1-59

Diretor-Geral do Instituto Adolfo Lutz

Dr. Helio Helh Caiaffa Filho.

Coordenadora

Maria Anita Scorsafava

Membros do Corpo Editorial

Cristina Takami Kanamura

Marcia de Souza Carvalho Melhem

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar

Pedro Luiz Silva Pinto

Sergio Dovidauskas

Núcleo de Acervo do IAL

Rocely A. Bueno Moita

ISSN (impresso) 1984-235X

ISSN (on line) 1984-2368

Carta ao Editor

Avenida Dr. Arnaldo, 355

Cerqueira César – CEP 01246-902

E-mail: bial@saude.sp.gov.br

Caixa postal 1783 – CEP 01059-970

São Paulo, SP – Brasil

Telefone: (0XX11) 3068-2869

Núcleo de Acervo

Assessoria Editorial:

M&W
COMUNICAÇÃO • INTEGRADA

Sumário

07	Avaliação microbiológica e físico-química da água-de-coco verde vendida no comércio ambulante
10	A Estabilidade do Ácido Peracético
13	Alterações no aspecto e odor de medicamentos: indicativos de desvio de qualidade
16	Obtenção do Certificado de Acreditação de Laboratórios de ensaios no instituto Adolfo Lutz
19	A descoberta, a ética e o sensacionalismo
21	Indicadores biológicos: segurança no processo de esterilização
23	Monitoramento do desempenho do eletrodo Íon seletivo de fluoreto através de métodos estatísticos
26	Comparação de dois ensaios imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 em população infectada pelo HIV
29	A criança febril sem causa aparente tem realmente uma virose?
31	Estudo retrospectivo da qualidade microbiológica e físico-química da água de soluções alternativas de abastecimento na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no período de 2008 a 2014
33	Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase na icterícia neonatal: avaliação de 10 anos do Instituto Adolfo Lutz-SP
36	Diversidade de isolados clínicos de <i>Cryptococcus gattii</i> por <i>Multi-locus sequence typing</i> no Estado de São Paulo
40	Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica
42	Qualidade microbiológica da água para consumo humano na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no biênio 2011-2012
45	O uso do ácido glioxílico em formulações cosméticas
47	Contribuição para a Epidemiologia da criptococose no Estado de São Paulo- dados do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no período de cinco anos
49	<i>Cryptococcus neoformans</i> : importância no diagnóstico clínico das formas polimórficas

51	Avaliação da ação desinfetante do ferrato(vi) em água para o consumo humano
54	Aplicação do ensaio de migração total na avaliação das embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos destinados a entrar em contato com alimentos
57	Leite Pasteurizado e ultra-alta temperatura (UAT): Avaliação do índice criscópio e valor de pH

Avaliação microbiológica e físico-química da água-de-coco verde vendida no comércio ambulante

**Aparecida de Fatima MICHELIN¹, Iris Gabriela GARCIA²,
Raquel Alves MAURÍCIO², Teresa Marilene BRONHARO¹,
Rosa ROWE²**

¹*Centro de de Laboratório Regional de Araçatuba-Instituto
Adolfo Lutz*

² *Instituto de Ciências da Saúde-Universidade Paulista – Campus
Araçatuba*

A água-de-coco verde, no interior da semente, corresponde a cerca de 25% do peso total do fruto e é composta basicamente por 93% de água, 5% de açúcares, além de proteínas, vitaminas e sais minerais¹. Apresenta propriedades funcionais, sendo utilizada amplamente pela cultura popular para repor eletrólitos em caso de desidratação. Tradicionalmente, é comercializada por ambulantes, na forma *in natura*, dentro do próprio fruto ou em vasilhames². O fruto, por ser rico em nutriente, pode propiciar rápido crescimento bacteriano após a abertura. As condições sanitárias do manipulador, do ambiente e dos equipamentos utilizados para abertura do fruto e o recipiente para a conservação, quando não servida no próprio fruto, podem ser fontes de contaminação microbiana e assim interferir na qualidade da água do coco. Ainda, tal contaminação, pode ser desencadeadora de alterações físico-químicas, como o pH, o grau de acidez e a presença de substâncias sólidas. As características sensoriais

também podem ser afetadas, especialmente o sabor e a cor³. Desse modo, independente da forma em que é comercializada há uma preocupação com a garantia da qualidade da água-de-coco, nos aspectos físico-químico e microbiológico.

Foram coletadas no comércio ambulante na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo 15 amostras de água-de-coco *in natura* envasadas mecanicamente através da utilização de um aparato portátil (carrinho). As amostras foram devidamente identificadas e acondicionadas em caixas térmicas com gelo e encaminhadas para os Laboratórios de Microbiologia e Química da Universidade Paulista, Campus Araçatuba – SP. Os estudos foram realizados no período de Junho de 2008 a Novembro de 2009. A metodologia utilizada na análise microbiológica para determinação de salmonela e coliformes baseou-se nas normas da *American Public Helth Association*⁴. A Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária⁵, que estabelece padrões microbiológicos para os

alimentos, determina que a água-de-coco deve apresentar ausência de *Salmonella* e um máximo de 10^2 NMP/mL de coliformes termotolerantes.

Foram realizadas análises quanto ao pH, acidez titulável e sólidos solúveis⁶. O valor de pH foi medido em 50 mL de amostra, empregando-se um pHmetro calibrado.

A avaliação das amostras revelou que das 15 amostras de água-de-coco, 13 (86,7%) apresentaram bactérias do grupo coliforme igual ou superior a 1.100 NMP/g e 2 (13,3%) apresentaram valores inferiores. Quanto à pesquisa de coliformes termotolerantes, das 13 amostras contaminadas com coliformes totais, 11 delas (84,7%) apresentaram coliformes termotolerantes, tendo sido detectada a presença de *Klebsiella* spp em 6 amostras (54,5%) e *Escherichia coli* nas demais amostras (45,5%) Contagens altas de coliformes também foram encontradas por Carvalho e colaboradores³ em mais da metade de amostras de água de coco avaliadas, inclusive com presença de coliformes termotolerantes.

A ocorrência de bactérias do grupo coliforme termotolerantes na maioria das amostras, com número superior ao permitido pela legislação vigente⁵, evidenciou que as condições higiênico-sanitárias de comercialização não estavam adequadas. Possivelmente, as inadequações ocorrem devido ao desconhecimento das normas de higiene e das condições sanitárias que devem ser cumpridas pelos trabalhadores. Carvalho e colaboradores³ concluíram que a superfície do carrinho e os instrumentos utilizados para a abertura do fruto constituem a maior fonte de contaminação. Além disso, a maior parte dos estabelecimentos de comércio ambulante não possui sistema de abastecimento de água tratada, dificultando a higienização dos utensílios e ainda a higiene pessoal⁷. Não foi observada a presença de *Salmonella*, nas amostras analisadas, estando de acordo com o encontrado por Carvalho e colaboradores³.

Quanto às análises físico-químicas, todas as

amostras de água-de-coco tiveram seus valores de pH acima de 4, sendo o valor médio superior a 4,5. A Instrução Normativa Nº 31, de 13 de agosto de 2009⁸ estabelece um valor mínimo de pH da água-de-coco resfriada de 4,3 e um máximo de 4,5. Resultados semelhantes foram encontrados por Amaral e colaboradores¹, cuja avaliação de amostras de água de coco após a conservação através do congelamento, apresentaram valores de pH acima de 4,7.

O valor médio encontrado para a acidez titulável das amostras foi de 0,121g de ácido cítrico/100 mL de amostra. Este valor está de acordo com o trabalho desenvolvido por Costa e colaboradores⁹, para água-de-coco processada, que apresentou valores de acidez na faixa de 0,11 e 0,12%.

O valor médio encontrado para sólidos solúveis (°BRIX) foi de 4,95, apresentando-se dentro dos limites previstos pela Instrução Normativa Nº 31, de 13 de agosto de 2009, que determina °BRIX máximo de 6,70. Os aspectos físico-químicos da água de coco devem sempre ser avaliados, uma vez que estão relacionados com o desenvolvimento de reações enzimáticas indesejáveis¹⁰.

As avaliações sensoriais das amostras de água-de-coco demonstraram que, das 15 amostras, 6 (40%) apresentavam-se fora do padrão de cor característica de água-de-coco, que, em condições normais, varia de transparente a translúcida. Todas as amostras apresentaram odor característico de água-de-coco.

Este estudo demonstrou que a qualidade microbiológica, físico-química e sensorial da água-de-coco foi insatisfatória. Dessa forma, seu consumo pode colocar em risco a saúde do consumidor. Assim, os resultados apontam para necessidade de um maior controle pelos órgãos de Vigilância Sanitária dos pontos de venda deste produto, contribuindo para a garantia da qualidade do produto e, conseqüentemente para a saúde dos seus consumidores.

REFERÊNCIAS

1. Amaral DS, Pessoa T, Dantas LSI, Medeiros SSSS. Elaboração de água de coco congelada e avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. *Revista Verde*. 2012;7(1):177-81.
2. Carvalho JM, Maia, GA, Sousa PHM, Junior, GAM. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. *Semina: Ciências Agrárias*. 2006;27(3):437-452.
3. Carvalho LR, Pinheiro BEC, Pereira SR, Borges MASF, Magalhães JT. Bactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de água de coco comercializada em Itabuna, Bahia. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 2012;36(3):751-63.
4. American Public Health Association (APHA). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21th ed. Washington, 2005.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.
6. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4 ed. Brasília: ANVISA; 2005. 1018p
7. Cardoso RCV, Loureiro ES, Neves DCS, Santos HTC. Comida de rua: um espaço para estudo na Universidade Federal da Bahia. *Revista Higiene Alimentar*. 2002;17(111):12-7.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 31, de 13 de agosto de 2009. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 14 de ago. 2009. Seção 1. p.32.
9. Costa LMC, Maia GA, Costa JMC, Figueiredo RW, Souza, PHM. Avaliação da água-de-coco obtida por diferentes métodos de conservação. *Ciênc. Agrotec*. 2005; 29(6):1239-47.
10. Kwiatkowski A, Oliveira DM, Clemente E. Atividade enzimática e parâmetros físico-químicos de água de cocos colhidos em diferentes estádios de desenvolvimento e estação climática. *Rev. Bras. Frutic*. 2012;34(2):551-9.

A Estabilidade do Ácido Peracético

Maria Cristina SANTA BÁRBARA, Ligia Luriko MIYAMARU

*Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes-
Centro de Medicamentos Cosméticos e Saneantes-Instituto
Adolfo Lutz*

O ácido peracético, uma combinação de ácido acético e peróxido de hidrogênio, surgiu no mercado mundial na segunda metade do século passado, sendo incluído como desinfetante/esterilizante pela Portaria nº 15 de 23/08/1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e reconhecido como princípio ativo autorizado pelo Ministério da Saúde. É classificado pela legislação vigente^{1,2} como desinfetante de alto nível com eficácia microbiológica comprovada, é biodegradável, proporciona alto poder germicida em baixas concentrações³ e mantém suas propriedades em presença de matéria orgânica, sendo recomendado como substituto ao uso do glutaraldeído 2% e do hipoclorito 1%.

Ao selecionar um agente químico para desinfecção, principalmente de artigos críticos hospitalares e dentários, é importante avaliar a eficácia na eliminação de microrganismos patogênicos e a toxicidade em tecidos humanos. Em adição, o agente não deve causar dano ao material que está sendo desinfetado, deve ser de uso simples e de custo razoável^{4, 5}. O hipoclorito de sódio e o glutaraldeído são desinfetantes recomendados e aceitos universalmente.

A solução de hipoclorito a 1% atua por 10 a 30 minutos e é instável, devendo ser armazenada ao

abrigo da luz, ar e calor, para evitar perda de cloro ativo. Possui odor forte e característico, podendo irritar os olhos e danificar roupas coloridas; é inativado por matéria orgânica e considerado prejudicial ao meio ambiente.

A solução de glutaraldeído 2% também atua por 10 a 30 minutos e pode provocar irritações nos olhos. Seu uso em spray não é recomendado, pois a inalação de aldeídos pode ser tóxica aos tecidos nasais e pulmonares; seu uso em 2010 foi proibido para serviços odontológicos no estado de São Paulo⁵. A literatura apresenta registros da avaliação do impacto negativo que o uso do glutaraldeído pode provocar à saúde dos trabalhadores que o manipulam (como, por exemplo, dermatite, problemas respiratórios e asma ocupacional), sugerindo o uso do ácido peracético como uma escolha mais segura à saúde.

Com a preocupação pela preservação do meio ambiente, o ácido peracético saiu do âmbito médico hospitalar e ganhou utilização na desinfecção dos sistemas de produção animal. Estudos demonstraram que os ácidos orgânicos são menos efetivos na presença de matéria orgânica; no entanto, o ácido peracético foi o mais eficaz frente ao *S.Aureus* e *E.Coli* independentemente desta presença e igualmente efetivo frente à *S Enteridis* na ausência de matéria orgânica, revelando-se uma opção válida para desinfecção na avicultura orgânica

desde que seja precedida por limpeza criteriosa. Neste contexto, o uso do ácido peracético também é utilizado na lavagem de vegetais minimamente processados, visando reduzir a carga microbiológica acompanhante e retardando a sua deterioração; é também uma opção para a sanitização em superfícies de cozinhas domésticas. Atualmente, o hipoclorito de sódio é o único sanitizante permitido pela legislação brasileira para este fim; embora eficiente, seu uso tem sido questionado pela provável formação de cloraminas orgânicas (compostos de alto potencial carcinogênico).

O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade do ácido peracético em relação à perda do ativo e a formação de ácido acético durante o período de validade de uma amostra comercial contendo 5% do ativo.

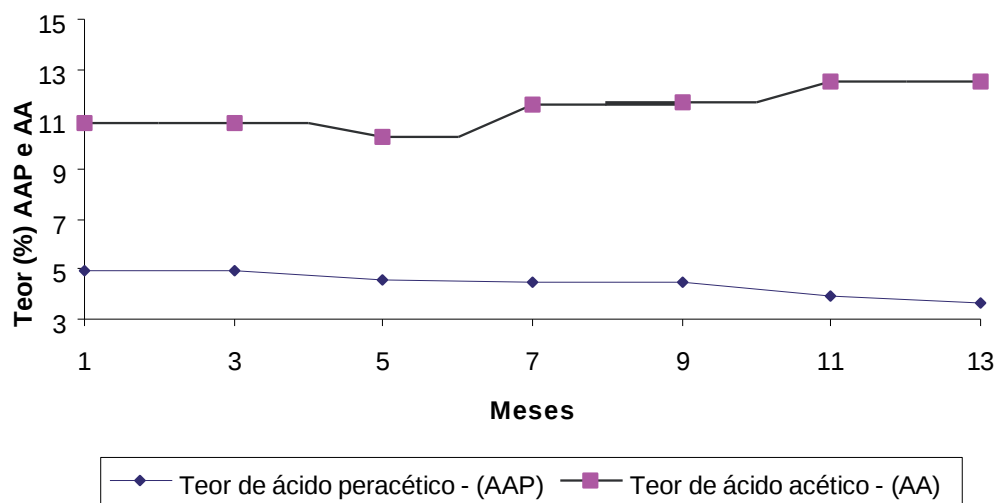
O ácido peracético e o ácido acético foram determinados na amostra após um mês da data de fabricação registrada no rótulo do produto, e a cada dois meses durante um ano (prazo de validade do produto). A determinação do ácido peracético foi realizada por permanganometria e iodometria: a amostra dissolvida em ácido sulfúrico diluído é titulada com permanganato de potássio para a eliminação do peróxido de hidrogênio e, em

seguida, adiciona-se iodeto de potássio – o iodo liberado é titulado com solução padronizada de tiosulfato de sódio; as determinações foram feitas em cinco replicadas a cada mês. A determinação do ácido acético foi realizada por titulometria de neutralização utilizando hidróxido de sódio 1,0 mol/L, também em cinco replicatas.

Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 1, onde podemos observar um decréscimo do teor de ácido peracético a partir do décimo mês, com aumento do teor de ácido acético. Este aumento é explicado pela decomposição espontânea do ácido peracético, com formação de oxigênio e elevação do pH durante o armazenamento. A análise estatística utilizando ANOVA/teste de Tukey demonstrou diferença significativa comparando-se as médias no início e no final da avaliação da estabilidade (p valor menor que 0,05).

Uma vez que estudos demonstram que o ácido peracético é eficaz na esterilização em soluções com concentrações de 0,2%, é importante determinar o teor de ácido peracético presente na amostra para uma correta diluição de uso, tendo em vista ainda que, em baixas concentrações, a decomposição é acelerada, com a solução tornando-se muito instável e o teor sendo reduzido em até 50%⁶.

Estudo da degradação do ácido peracético



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Resolução RDC nº 31 04 de Julho de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre a indicação de uso dos produtos saneantes na categoria “Esterilizante”, para aplicação sob a forma de imersão, a indicação de uso de produtos saneantes atualmente categorizados como “Desinfetante Hospitalar para Artigos Semicríticos” e dá outras providências. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 de Julho de 2005 Seção I.
2. Brasil. Resolução RDC nº 35 16 de Agosto de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizado sem artigos críticos e semicríticos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de Agosto de 2010, Seção I, p 44 - 46.
3. Santa Bárbara MC, Miyamaru LL, Yano HM, Almodóvar AAB, Lima RF, Aurichio MT, Bugno A. Qualidade de saneantes e antissépticos utilizados em hospitais da rede pública. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012;71(4):650-5.
4. Fracaro GA, Juchem C, Correa AM, Samuel SMW. A influência da imersão em ácido peracético sobre a reprodução de detalhes e compatibilidade dos elastômeros com gesso. Rev. Odonto Cienc.Fac.Odonto/PUCRS. 2007;22 (55): 61-5.
5. Albrech L, Barbieri DSV, Bley Sobrinho J, Gudisch KBB, Neiva I. Eficácia microbiológica de soluções desinfetantes em moldes de hidrocolóide irreversível (alginato) frente à *Streptococcus* do grupo mutans. Trabalho apresentado no VI Congresso Panamericano. X Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Porto Alegre, 2006.
6. Silva SM. Estudo da cinética de decomposição de soluções de ácido peracético contaminadas com material orgânico [dissertação de mestrado]. São Caetano do Sul: Centro Universitário Instituto Mauá de Tecnologia; 2010.

Alterações no aspecto e odor de medicamentos: indicativos de desvio de qualidade

NHelenam Miyoco YANO, Blanca Elena Ortega MARKMAN, Jaqueline Kalleian ESERIAN, Márcia LOMBARDO, Luz Marina TRUJILLO, Valéria Adriana Pereira MARTINS

¹*Centro de Medicamentos Cosméticos e Saneantes - Instituto Adolfo Lutz*

A Assistência Farmacêutica, parte das diretrizes da Política Nacional de Medicamentos (Portaria GM/MS nº 3.916/98)¹ é considerada uma das atividades prioritárias da assistência à saúde. Compreende um conjunto de atividades relacionadas ao acesso e ao uso racional de medicamentos destinados a complementar e apoiar as ações de atenção à saúde. O medicamento é essencial, visto que nenhum outro fator, isoladamente, influencia tanto a capacidade resolutiva dos serviços de saúde, sendo considerado insumo estratégico para a melhoria da saúde da população.

A implementação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) em medicamentos², obrigatória e regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), visa garantir a qualidade da produção de medicamentos. Os processos de vigilância estabelecidos pela ANVISA consistem nas ações de registro e auditorias nas indústrias farmacêuticas, monitoramento da qualidade dos medicamentos, fiscalização e farmacovigilância na pós-comercialização. A vigilância pós-comercialização é uma atividade que busca detectar possíveis eventos adversos, falta de eficácia terapêutica, ou desvios de qualidade que possam acontecer depois que um produto entra na fase de comercialização, e que não puderam ser detectados nos testes e ensaios realizados durante a fase de pré-comercialização³. A forma farmacêutica de um

medicamento é o estado final de apresentação que as substâncias ativas farmacêuticas possuem após seu desenvolvimento farmacotécnico, a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas a via de administração. O Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do Instituto Adolfo Lutz participa do Monitoramento da Qualidade de Medicamentos de Programas com a Vigilância Sanitária como Saúde da Mulher, Saúde Mental, Dose Certa, assim como atende queixas técnicas de usuários com relatos de desvios de qualidade que incluem alteração da cor, presença de partículas estranhas, comprimidos fragmentados, entupimento da agulha em suspensões injetáveis, odor e sabor desagradável, presença de grumos em suspensões para uso oral, vazamento do conteúdo de cápsulas, cápsulas empedradas, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi analisar as notificações de medicamentos, relacionadas à alteração no aspecto que ocasionaram suspeita de desvio de qualidade, em programas de monitoramento da qualidade de medicamentos e notificações de usuários por meio dos serviços de vigilância sanitária.

A análise de aspecto consistiu na avaliação visual do medicamento, tendo como referência a sua especificação constante no registro na ANVISA. Foram analisadas 36 amostras, constituídas de diversas apresentações farmacêuticas e classes

terapêuticas, nas modalidades de análises de orientação e análises fiscal, constituídas de comprimidos, cápsulas, suspensões e soluções injetáveis, soluções, pó para suspensões, e suspensões orais e géis.

Das 36 amostras analisadas quanto ao ensaio de aspecto, 21(58,4%) apresentaram resultados insatisfatórios, confirmando as queixas técnicas. Na tabela 1 estão apresentadas as diversas formas farmacêuticas analisadas e o resultado referente ao aspecto alterado, em relação à especificação do produto.

Tabela 1. Formas farmacêuticas e resultados insatisfatórios

Formas farmacêuticas	Quantidade de amostras	Alterações observadas
Comprimidos	16	Rachados, esfarelados, presença de partículas estranhas, cor com presença de pontuações mais escuras
Soluções	08	Presença de corpo estranho, alteração de cor, odor
Suspensão oral	01	Presença de grumos
Pó para suspensão e solução (injetável)	10	Presença partículas ou grumos após a reconstituição
Pó	01	Indício de alteração do produto (odor)

resultados.

Os desvios de qualidade no aspecto dos medicamentos podem ser atribuídos a diversos fatores como o teor de água acima do limite, tamanho inadequado das partículas e problemas com excipientes, no caso de pós para suspensões injetáveis, afetando diretamente a suspensibilidade. A exposição à luz e ao calor, embalagens inadequadas e alto teor de umidade podem alterar a cor e odor do produto. Apesar da implementação das BPF, desvios de qualidade são detectados, sendo o monitoramento da qualidade de medicamentos durante a fase pós-comercialização um fator considerado importante para garantir a segurança de uso e a eficácia terapêutica, promovendo o uso racional de medicamentos e prevenindo os riscos sanitários⁴. O Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do Instituto Adolfo Lutz tem participado de programas de monitoramento da qualidade de medicamentos com objetivo de colaborar nas atividades relacionadas à promoção do acesso a medicamentos pela população, implementando ações ligadas à Vigilância Sanitária para oferecer garantia quanto à qualidade e segurança destes importantes componentes de atenção à saúde.

Na figura 1 estão apresentadas as classes terapêuticas analisadas e com seus respectivos

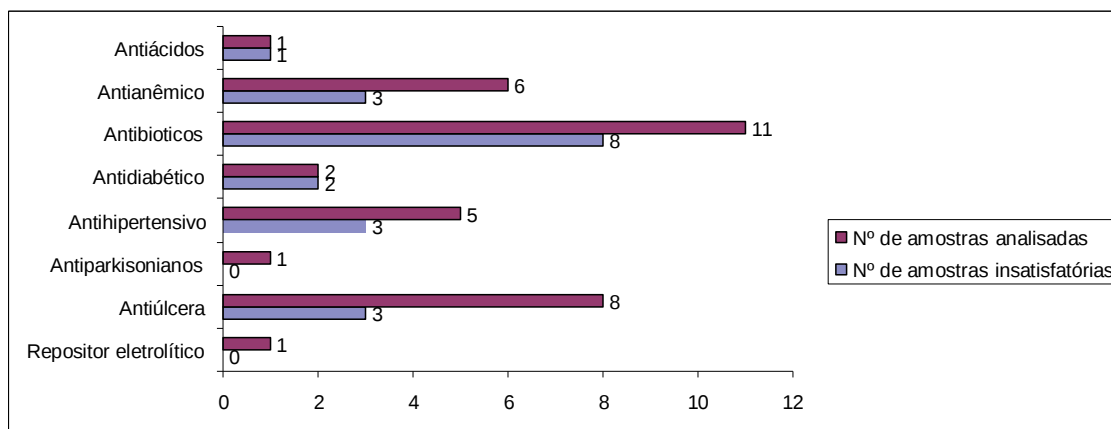


Figura 1. Amostras analisadas quanto às classes terapêuticas

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria GM nº 3.916, 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, s. 1, n. 215-E, p. 18, 10 nov, 1998.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, dispõe sobre Boas Práticas de fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de abr. 2010a.
3. Graff S. Vigilância Pós-Comercialização: aprendendo a atender o consumidor com reação adversa. São Paulo: Scor Editora Tecci, 2012.
4. Quem aVISA amigo é: A cartilha da Vigilância Sanitária. Centro Colaborador em Vigilância Sanitária da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Cecovisa/Ensp/Fiocruz). Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/visa>.

Obtenção do Certificado de Acreditação de Laboratórios de ensaios no instituto Adolfo Lutz

Márcia Liane BUZZO¹, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR², Maria de Fátima Henriques CARVALHO¹, Paulo TIGLEA¹, Adriana BUGNO³, Miyoko JAKABI⁴, Ligia Luriko Miyamaru⁵

¹Núcleo de Contaminantes Inorgânicos-Centro de Contaminantes-Instituto Adolfo Lutz

²Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança-Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes-Instituto Adolfo Lutz

³Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes- Instituto Adolfo Lutz

⁴Núcleo de Microbiologia Alimentar-Centro de Alimentos-Instituto Adolfo Lutz

⁵Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos-Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes-Instituto Adolfo Lutz

O mercado mundial vem demandando novas abordagens com respeito à qualidade de produtos e processos. Desta forma, os laboratórios de ensaio e calibração têm se estruturado no atendimento aos requisitos de gestão da qualidade, implementando uma sistemática que propicie um adequado grau de confiança na prestação de serviço. Para gerar confiança na atuação de tais organizações que executam atividades de avaliação de conformidade, a acreditação é uma ferramenta estabelecida para o reconhecimento formal por um organismo de acreditação, de que estas organizações atendem a requisitos previamente definidos, demonstrando competência para realizar suas atividades com

resultados de medições confiáveis e exatos, com rastreabilidade metrológica comprovada, promovendo, desta forma, credibilidade e aceitação além das fronteiras nacionais¹.

No Brasil, a Coordenação Geral de Acreditação de Laboratórios (CGCRE), da Divisão de Credenciamento de Laboratórios (DICLA), pertencente ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), é o organismo responsável pela implementação do sistema de acreditação de laboratórios de ensaios e de calibração no Brasil e segue diretrizes que o colocam em equivalência com o de outros organismos internacionais congêneres². É reconhecido por seus pares signatários do Acordo

de Reconhecimento Multilateral com a International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), com o International Accreditation Forum (IAF) e com a Interamerican Accreditation Cooperation (IAAC), em cumprimento aos requisitos gerenciais e técnicos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025³.

Assim, considerando o estabelecimento, implementação e manutenção do Sistema de Gestão da Qualidade de acordo com os requisitos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, aliados à importância da necessidade de atendimento a clientes e autoridades reguladoras, na emissão de resultados analíticos confiáveis, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) em março de 2013, representado por quatro laboratórios de análises físico-químicas e microbiológicas de produtos e de fluido biológico, participou de processo avaliativo junto ao INMETRO, para a obtenção do selo de acreditação de ensaios.

Para este fim, desde junho de 2012, os laboratórios candidatos à acreditação de ensaios: Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Núcleo de Microbiologia Alimentar e Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos uniram esforços para a solicitação de registro junto ao Sistema Orquestra da CGCRE. Este sistema tem o objetivo de gerenciar e otimizar as atividades de acreditação (ou extensão de escopo de laboratórios acreditados). As atividades incluíram a compilação e o envio de documentos de todos os laboratórios do IAL candidatos à acreditação, para a formalização e análise prévia pelo CGCRE, para a concessão de avaliação, bem como no estabelecimento da equipe de avaliadores.

No período de avaliação, foram verificados os requisitos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 referentes aos itens gerenciais e técnicos, incluindo políticas e procedimentos adotados no IAL, bem como o acompanhamento de análises laboratoriais dos ensaios postulantes à acreditação.

Dentre os requisitos gerenciais, além da

análise documental de políticas, procedimentos e anexos dos laboratórios candidatos, também foram envolvidos outros setores do IAL, pertinentes à avaliação, como: Núcleo de Qualidade; Centro de Administração (Núcleo de Compras e Suprimentos, Núcleo de Informática e Núcleo de Suprimentos); Centro de Infraestrutura; Centro de Recursos Humanos (Núcleo de Seleção e Desenvolvimento de Recursos Humanos); Núcleo de Gerenciamento de Amostras, Produtos e Processos; Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas e Ouvidoria. Os principais itens avaliados foram: controle de documentos; análise crítica de pedidos, propostas e contratos; aquisição de serviços e suprimentos; controle de trabalhos de ensaio não-conforme; ação preventiva; ação corretiva; atendimento ao cliente; reclamações; auditorias internas e análise crítica pela direção.

Com relação ao atendimento dos requisitos técnicos laboratoriais, dentre os principais parâmetros de medição avaliados, destacaram-se: métodos de ensaio; validação de métodos analíticos; emprego de solução-padrão ou de Material de Referência Certificado contendo certificados emitidos por empresa acreditada pela Norma ISO GUIA 34⁴; acompanhamento de desempenho da variabilidade de processos empregando cartas controle; calibração de equipamentos; análise crítica de equipamentos calibrados; participação e avaliação de controle interno e externo da qualidade e cálculo de estimativa de incerteza.

Após a avaliação e apresentação do Relatório de Avaliação de Laboratório-RAV pelos avaliadores, contendo as evidências dos itens conformes e não-conformes, foram tomadas as ações pertinentes com relação às não-conformidades, dentro do prazo concedido. Deste modo, em dezembro de 2013, o Instituto Adolfo Lutz recebeu o certificado de reconhecimento formal da competência técnica para a realização de 68 ensaios físico-químicos e microbiológicos, abrangendo: água para consumo humano; água envasada; água para

diálise; cosméticos, produtos de higiene, saneantes e suas matérias primas; medicamentos, produtos farmacêuticos, matérias primas e artigos para saúde; indicador biológico de esterilização e sangue, recebendo Número de Acreditação CRL 0679⁵.

Assim, considerando a crescente demanda por resultados de medição confiáveis e com rastreabilidade metrológica comprovada, e visando reforçar a confiança do público nos serviços prestados e incrementar a imagem de competência e capacidade de inovação da Instituição, conclui-se que a extensão do escopo da acreditação de ensaios no IAL é recomendável aos laboratórios que já possuem ensaios acreditados, e que é fundamental estimular novos laboratórios a postular a acreditação, promovendo competência técnica no atendimento a clientes no desenvolvimento de suas tarefas de avaliação da conformidade de produtos, e no atendimento a antigos e novos desafios de Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Acreditação. Acesso em: [25 mar 2014]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento].
2. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Orientação para a acreditação de laboratórios, produtores de materiais de referência e provedores de ensaio de proficiência. DOQ-CGCRE-001. Revisão 10. Junho de 2014. Acesso em: [02 jul 2014]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-1_10.pdf].
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT, 2a ed., p.31, 2012.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT ISO GUIA 34 – Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. ABNT, 1a ed., p.41, 2012.
5. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Informações sobre o escopo da acreditação CRL 0679. Acesso em: [26 mar 2014]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0679.pdf].

A descoberta, a ética e o sensacionalismo

¹Adelina Buzini COSTA E SILVA, ²Cecilia Cristina Marques dos SANTOS

¹UNESP- IBILCE - São José do Rio Preto –SP (docente aposentada)

²Núcleo Ciências Químicas e Bromatológicas-Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto

A atividade jornalística está em constante busca de novos assuntos e, conseqüentemente, de resultados imediatos que alimentem o público com novidades. Em geral, a fórmula certa passa pelo sensacionalismo, exagero e pseudas polêmicas.

Por outro lado, a pesquisa científica é necessariamente mais lenta, uma vez que, requer testes e comprovações que levam tempo para serem validados. O tempo porém, não constitui um fator que impeça o pesquisador de divulgar a sua pesquisa, ao contrário, lhe traz a fundamental segurança para expor à sociedade a conclusão do seu trabalho.

Há de se refletir sobre as formas pelas quais os diversos veículos de comunicação têm divulgado os resultados da pesquisa científica. Sem dúvida, há uma progressiva melhora na abordagem da ciência, pela mídia em geral, mas ainda enfrentamos a força das manchetes que resume e simplifica em uma única frase “rentável” a complexidade, o esforço e a ousadia de uma pesquisa científica.

Assim, surgiu a ideia da Síntese da Criação com o anúncio da primeira “bactéria sintética”.

A pesquisa do americano Craig Venter permitiu que o núcleo genético de uma bactéria projetado por computador e elaborado em

laboratório, constituísse na mais próxima forma de vida que a ciência alcançou criar.

Sabe-se que Craig não partiu de matéria inanimada e com ela produziu um ser vivo, e sim apenas orientando-se por meio de *softwares* reorganizou o material genético de uma bactéria (2010): apagou o *software* biológico e enxertou outro muito parecido.

Este não é o maior avanço genético de todos os tempos. O título fica ainda, com Watson e Crick, pais da biologia molecular, em 1953, ao decifrar e propor uma estrutura para o ácido desoxirribonucléico (DNA).

Charles Darwin (1859) com a teoria da evolução natural criou os fundamentos da biologia moderna e seus preceitos ainda continuam, de que “Todo ser vivo tem um antepassado” e a nova pesquisa não criou um organismo a partir do zero.

Entretanto, a façanha de Craig significa um salto para a engenharia genética com possibilidades práticas nas áreas de agronomia, produção de vacinas, “criação de algas” que convertam o dióxido de carbono em biocombustível em escala eficaz do ponto de vista econômico, entre outras. Conforme alguns pronunciamentos de pesquisadores, a descoberta reforça a aplicação da tecnologia na

resolução de problemas ligados ao meio ambiente.

Os geneticistas apresentam com cautela os resultados de suas pesquisas denotando certa humildade. O sensacionalismo dos resultados de Craig fica por conta da onda de euforia da “euforia triunfalista” que percorreu de ponta a ponta do planeta, pelas conexões da internet.

É necessário cautela na aceitação dos resultados obtidos e cuidado na utilização da retórica evitando domínio do poder do conhecimento. Tais pesquisas e, principalmente, a divulgação de seus resultados por meios não científicos e suas consequências, nos faz refletir sobre a questão ética da pesquisa científica, uma vez que direta ou indiretamente afetará o ser humano.

A humanidade já passou por situações de verdadeiras barbaridades e nos conduziu a criação

da Declaração de Helsink, entendida como um dos documentos que representam as teses democráticas dos povos e, portanto, patrimônio da humanidade, pelo seu valor de referência como diretrizes éticas a serem observadas em pesquisa.

Em 1999, houve uma tentativa de reversão de algumas teses historicamente humanitárias com visão exclusivamente no lucro. Em uma era de globalização e fundamentalismo econômico fica a cargo do pesquisador preservar a sua independência, a criatividade e sobretudo a sua responsabilidade do bom uso de suas descobertas, lembrando que: ***“A abelha por Deus foi amestrada. Sem haver um processo bioquímico. Até hoje não houve nenhum químico pra fazer a ciência dizer nada” (Zé Ramalho).***

Indicadores biológicos: segurança no processo de esterilização

**Fernando Pontes de Lima e SILVA¹, Aurélio da ROCHA¹,
Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR¹, Adriana
BUGNO²**

¹Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de
Medicamentos, Cosméticos e Saneantes - Instituto Adolfo Lutz.

²Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes - Instituto
Adolfo Lutz.

Os indicadores biológicos são caracterizados como uma preparação padronizada de micro-organismo específico, da ordem de 10^6 esporos de micro-organismos por unidade de papel de filtro ou carreador, e que apresenta resistência definida e estável a um determinado processo de esterilização^{1,2}. Em geral, são obtidos de culturas microbianas puras, de fácil cultivo e identificação, não devem ser patogênicos e, fundamentalmente, serem apropriados ao tipo de processo de esterilização para o qual serão utilizados³. São empregados na qualificação de desempenho do equipamento de esterilização, processos de obtenção de produto estéril em seu recipiente final, esterilização de equipamentos e componentes de embalagem empregados em processos assépticos e, ainda, no monitoramento de ciclos de esterilização em revalidações periódicas¹. É importante ressaltar que os indicadores biológicos devem ser considerados apenas como um método adicional de monitoramento dos processos de esterilização e, quando utilizados, devem ser tomadas precauções estritas para evitar a transferência de contaminação microbiana a partir dos mesmos⁴.

A cepa recomendada, por compêndios

farmacopêicos, para o processo de esterilização por calor seco ou Óxido de Etileno é *Bacillus subtilis*, cujos esporos são mortos com relativa facilidade em processo térmico a vapor, diferenciando-se devido a seu crescimento em película sobre meios líquidos e produção de pigmento laranja. Para processos de esterilização por calor úmido, a cepa recomendada é *Geobacillus stearothermophilus*, por apresentar resistência ao vapor de água, ácido peracético e peróxido de hidrogênio, sendo relativamente sensível ao calor seco³.

A preparação de suspensões estoque dos esporos dos micro-organismos selecionados requer procedimentos apropriados como: cultivo, coleta, purificação e manutenção¹. Sua disponibilização comercial apresenta-se em tiras de papel ou cupons metálicos³, e a produção deve obedecer a padrões rígidos e serem realizados em laboratórios qualificados. Deste modo, alguns requisitos devem ser considerados com relação ao micro-organismo teste: apresentar quantidade suficiente de acordo com padrão determinado (1 milhão de esporos ou 10^6 esporos bacterianos por papel de filtro ou outro carreador), oferecendo maior desafio ao processo; deve permitir a penetração do agente esterilizante;

além de leitura inequívoca entre o resultado positivo e o resultado negativo².

O Núcleo de Ensaio Biológicos e de Segurança do Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, através da execução de análise de indicadores biológicos de esterilização, atua na verificação da adequação de processos de esterilização, visando assegurar sua eficácia para o uso pretendido. Assim, no período de Fevereiro de 2007 a Outubro de 2013, foram avaliadas 1235 amostras de indicadores biológicos de esterilização, sendo 1148 (92,9%) pertencentes ao gênero *Geobacillus stearothermophilus* e 87 (7,1%) ao gênero *Bacillus subtilis*, seguindo as recomendações preconizadas pela Farmacopéia Americana, USP 35ª edição⁵.

A análise dos resultados obtidos indicou que 71 (6,2%) do total das amostras de indicadores biológicos de esterilização destinados à avaliação de processos por calor úmido apresentaram resultados insatisfatórios, tendo sido evidenciado crescimento microbiano, sugerindo que o processo ao qual foram submetidos não demonstrou eficiência, não eliminando os esporos contidos na preparação. Neste caso, o equipamento empregado para o processo de esterilização deve ser avaliado quanto ao seu desempenho, devendo ser realizada sua manutenção corretiva. Com relação à avaliação das amostras de indicadores biológicos de esterilização destinados à avaliação de processos por calor seco, observou-se que apenas 01 (1,1%) do total deste grupo, apresentou resultado insatisfatório, não eliminando os esporos da preparação.

Foi evidenciado também que 74 (6,4%) das amostras de indicadores biológicos destinadas à avaliação de processos por calor úmido,

apresentaram resultados não conclusivos, pois os controles positivos (os quais não foram submetidos ao processo de esterilização), encaminhados juntamente com as amostras, não demonstraram sinal de crescimento microbiano, permitindo supor que os indicadores biológicos apresentavam desvio da qualidade requerida.

A utilização de indicadores biológicos constitui-se em uma ferramenta adequada para a avaliação da eficácia dos processos de esterilização, minimizando os erros de interpretação. É importante garantir a confiabilidade da esterilização de materiais ou produtos, visto que um resultado falso-positivo pode ocasionar um dano econômico e operacional, onde artigos serão re-esterilizados sem necessidade. Entretanto, o resultado falso-negativo gera uma sensação de segurança indevida e um potencial risco ao paciente, pois não detecta falhas no equipamento de esterilização.

REFERÊNCIAS

1. Farmacopeia Brasileira. 5a ed. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
2. Padoveze MC, Graziano KU, Borrasca VL, Ferreira AS. Limpeza, desinfecção e esterilização de artigos em serviços de saúde. São Paulo: APECIH, 2010.
3. Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto AF. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3a ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2010.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. acesso em: [2013 out 16]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html]
5. United States Pharmacopeia. 35a ed. Maryland (United States); 2012.

Monitoramento do desempenho do eletrodo Íon seletivo de fluoreto através de métodos estatísticos

Isaura Akemi OKADA¹, Marina Miyuki OKADA¹, Rita de Cássia BRIGANTI¹, Sérgio DOVIDAUSKAS¹

1Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas - Centro de Laboratórios Regional de Ribeirão Preto - Instituto Adolfo Lutz

O comportamento não-nernstiano do eletrodo íon-seletivo de fluoreto a baixas concentrações já havia sido constatado em 1966, quando Frant e Ross publicaram o primeiro artigo descrevendo a sua construção, funcionamento e aplicação¹. Esta perda de linearidade tem sido atribuída à contaminação dos reagentes das soluções-tampão utilizadas e à variação na solubilidade do cristal de LaF_3 dopado com Eu^{3+} (a membrana sólida que constitui o sensor): por exemplo, o citrato utilizado em alguns tampões poderia complexar com a membrana cristalina, aumentando a solubilidade do LaF_3 ; o acetato, também utilizado em tampões, não somente complexaria como também participaria de reações de troca iônica não reversíveis com a membrana, o que resultaria na associação definitiva acetato-membrana, caracterizando um envenenamento gradual e progressivo do eletrodo, comprometendo sua exatidão e precisão^{2, 3}.

Neste trabalho apresentamos o monitoramento do desempenho do eletrodo íon-seletivo de fluoreto durante dois anos consecutivos

na análise de águas de abastecimento público (fevereiro de 2012 a janeiro de 2014), utilizando métodos estatísticos (ANOVA dois fatores com repetição seguida de testes Tukey, e estatística PG da ISO 8466-1⁴). O objetivo foi acompanhar uma possível perda de linearidade a concentrações mais baixas com o uso frequente do eletrodo, de modo a antecipar ações corretivas no sentido de manter a qualidade analítica dos resultados.

As análises de fluoreto foram conduzidas por potenciometria com eletrodo íon-seletivo (marca Digimed, modelo DMI-FL2), utilizando 5 soluções-padrão (0,30 a 1,50 mgF^-/L) para a construção de curvas analíticas, e tampão TISAB III ($\text{pH} = 6,0$) na proporção 1:10 (tampão:amostra). As análises estatísticas (softwares *Microsoft Excel2010*[®] e *OriginPro9.0*[®]) foram conduzidas em dez medidas de potenciais de cada solução-padrão, com os dados sendo coletados no último mês de cada um dos quatro semestres abrangidos por este estudo (Tabela 1), utilizando-se nível de significância igual a 0,05.

Tabela 1. Potenciais (mV) das soluções padrão de fluoreto no último mês de cada semestre.

	Solução padrão				
	0,3 mgF ⁻ /L	0,5 mgF ⁻ /L	0,8 mgF ⁻ /L	1,0 mgF ⁻ /L	1,5 mgF ⁻ /L
Semestre 1	164,6	150,6	138,6	132,2	123,3
	164	150,9	138,7	133,5	123,1
	160,7	149,2	138,4	132,7	122,3
	162,7	150,7	138,9	132,9	121,6
	161,7	149,4	137,1	130,7	120,4
	162,4	152,4	140,1	134,5	123,3
	164	152,8	140,8	134,1	123,5
	163,9	153	140,5	133,6	122,6
	162,5	151,1	138,8	133,1	122
	162,4	151,8	139,8	133,1	123,5
média ± desvio padrão	162,9 ± 1,2	151,2 ± 1,3	139,2 ± 1,1	133,0 ± 1,1	122,6 ± 1,0
Semestre 2	163,3	152,4	139,9	134,4	123,3
	162,4	150,8	139	133,5	122,8
	161,8	151,6	139,3	133,7	122,3
	162,6	152,6	139,5	134,7	123,7
	163,1	151,8	139,8	133,4	123,3
	162,5	150,7	139,3	133,5	124
	163,4	152,8	140,2	135,4	124,4
	162,9	149,7	138,8	133,1	122,5
	163,9	152,3	140,2	134,9	124,2
	163	151,5	139,7	133	122,6
média ± desvio padrão	162,9 ± 0,6	151,6 ± 1,0	139,6 ± 0,5	134,0 ± 0,8	123,3 ± 0,7
Semestre 3	159,7	150,7	138,5	132,6	122,4
	161,9	150,3	138,5	132,7	122,6
	162	149,6	139	132,7	121,6
	159,7	149,1	138,1	132,5	122,2
	163,8	153,1	140,2	135,6	124,1
	165,5	155,1	142,9	136,8	126,2
	164,8	153,6	141,2	135	124,5
	164,7	153,9	141,4	135,7	124,8
	163,6	152,7	140,7	134,9	123,5
	163,3	151,1	139,6	134,1	122,8
média ± desvio padrão	162,9 ± 2,0	151,9 ± 2,0	140,0 ± 1,5	134,3 ± 1,6	123,5 ± 1,4
Semestre 4	161,6	148,2	139,2	133,7	123,4
	161,2	151,2	139	133,8	123,4
	162,2	152,9	141,3	135,7	125,8
	159,1	153	142,4	136	125,9
	165,2	153,1	141,5	136,4	125,8
	163,7	152,4	140	133,1	123,9
	164	152,3	141,1	135,5	124,4
	163,8	152,1	139,4	133,8	124,1
	165,5	151	141,1	134,3	124,8
	162,8	151,1	139,8	134,4	123,6
média ± desvio padrão	162,9 ± 2,0	151,7 ± 1,5	140,5 ± 1,1	134,7 ± 1,1	124,5 ± 1,0

Observando os dados da Tabela 1, verifica-se que as médias mensais dos potenciais entre os semestres não podem ser diferenciados para uma mesma concentração de solução padrão devido às dispersões dos dados (expressas como desvio padrão). Contudo, observa-se também uma tendência de aumento de potenciais para as concentrações 0,8; 1,0 e 1,5 mg/L. Este aumento sugere uma perda gradual da linearidade entre os pontos da curva de calibração, como mostrado na Figura 1.

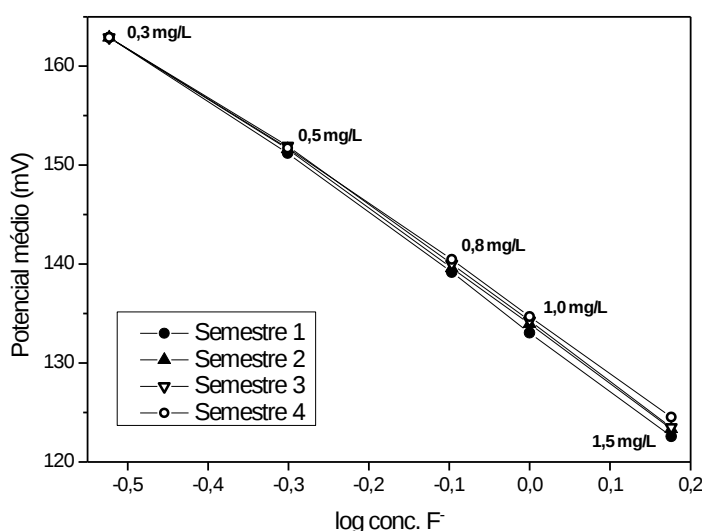


Figura 1. Potenciais médios em função do logaritmo da concentração de fluoreto.

A ANOVA de dois fatores (com repetição) dos dados individuais de cada semestre indicou diferença estatisticamente significativa entre os semestres ($F_{\text{crítico}} = 2,65$; $F_{\text{calculado}} = 6,15$; $p = 0,00053$). Os testes Tukey entre os semestres indicou que os potenciais relativos ao terceiro e quarto semestres eram significativamente diferentes dos potenciais relativos ao primeiro semestre ($p_{\text{sem3/sem1}} = 0,0256$;

$p_{\text{sem4/sem1}} = 0,00027$).

A estatística PG^4 aplicada às médias mensais ao final de cada semestre apresentou as seguintes estimativas: 8,2 (1º semestre); 12,3 (2º semestre); 22,7 (3º semestre); 23,2 (4º semestre) – os valores de PG para o 3º e 4º semestres superaram o valor de F_{tabelado} (igual a 18,5), indicando que uma regressão polinomial de segunda ordem apresentaria um melhor ajuste aos dados destes semestres do que uma regressão linear.

Dos testes estatísticos aplicados, somente a estatística PG foi capaz de estimar a perda de linearidade ao longo do tempo, na faixa de concentrações utilizada na construção das curvas analíticas. Em adição, o aumento gradual desta estatística, aproximando-se inicialmente do valor limite (igual a 18,5) e posteriormente ultrapassando-o, sugeriu diminuição gradual de eficiência do eletrodo no período, o que conduziu à ação de providenciar a sua substituição ao final do 4º semestre.

REFERÊNCIAS

1. Frant MS, Ross JW. Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*. 1966;154:1553-1555.
2. Nicholson K, Duff EJ. Fluoride determination in water: an optimum buffer system for use with the fluoride-selective electrode. *Anal Letters*. 1981;14(A12):887-912.
3. Fouskaki M, Sotiropoulou S, Koci M, Chaniotakis NA. Morpholinoethanesulfonic acid-based buffer system for improved detection limit and stability of the fluoride ion selective electrode. *Anal Chim Acta*. 2003;478:77-84.
4. ISO. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. International Organization for Standardization. 1990:ISO 8466-1.

Comparação de dois ensaios imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 em população infectada pelo HIV

¹ Carlos Henrique BARRETO-DAMIÃO^{1*}, Karoline Rodrigues CAMPOS¹, Maria Gisele GONÇALVES¹, Nadia Aparecida COSTA^{1}, Mariana Cavalheiro MAGRI², Wong Kuen ALENCAR³, Adele CATERINO-DE-ARAUJO¹**

**Bolsista de Iniciação Científica FAPESP*

***Bolsista de Treinamento Técnico em Pesquisa TT3 FAPESP*

¹Centro de Imunologia - Instituto Adolfo Lutz

²Laboratório de Investigação Médica-M47-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

³Centro de Referência em DST/Aids de São Paulo-SP-Brasil

O Brasil é o país do continente americano com o maior número de pessoas infectadas pelo vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) com estimativa de 800.000 infectados¹. Já o HTLV-2 é endêmico em índios da Amazônia e em usuários de drogas injetáveis². Em 1993, a sorologia para estes vírus tornou-se obrigatória em Bancos de Sangue no Brasil³. Desde novembro de 1998, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo realiza a sorologia para HTLV-1/2 em população de risco e tem observado problemas no diagnóstico, principalmente de HTLV-2². Foi observado que o emprego de apenas um ensaio imunoenzimático (EIA) para pesquisa de anticorpos específicos era insuficiente para detectar todos os casos verdadeiramente positivos e assim passou-se a utilizar dois EIA de princípios e composições antigênicas diferentes⁴⁻⁶. A partir de 2013, encontram-se disponíveis no mercado nacional apenas kits de 3ª geração que utilizam peptídeos sintéticos e/ou proteínas recombinantes como antígeno e conjugado. O presente estudo objetivou comparar a eficiência de dois kits EIA

de 3ª geração disponíveis no mercado nacional: um de procedência estrangeira e outro nacional na triagem de infecção por HTLV-1/2 em pacientes do CRT DST/Aids de São Paulo. Amostras de sangue de 1.608 pacientes infectados pelo HIV que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE (Plataforma Brasil CAAE 11302512.0.0000.0059) foram testadas quanto à presença de anticorpos anti-HTLV-1/2 usando os kits Murex HTLV I+II, Diasorin, UK e Gold ELISA HTLV-I/II, REM, SP, seguindo as instruções dos fabricantes. Os resultados foram avaliados em relação aos obtidos nos testes confirmatórios de *Western Blot* (HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals) e/ou PCR em tempo real “in house” (*pol*) (protocolo de Costa et al., 2011)⁷. Houve detecção de 51 amostras de sangue reagentes pelo kit Murex. Destas, uma resultou negativa no WB e na PCR. O kit Gold ELISA detectou 49 amostras reagentes: não detectou a amostra WB e PCR negativa e outra amostra com perfil indeterminado no WB (presença de rgp46-II e p24) e PCR positiva para HTLV-2. O resultado da densidade ótica/*cut off* (DO/CO) desta amostra de soro no Gold ELISA

foi 0.251/0.281 (0,9), ou seja, na zona cinza (em evidência na **Figura** abaixo).

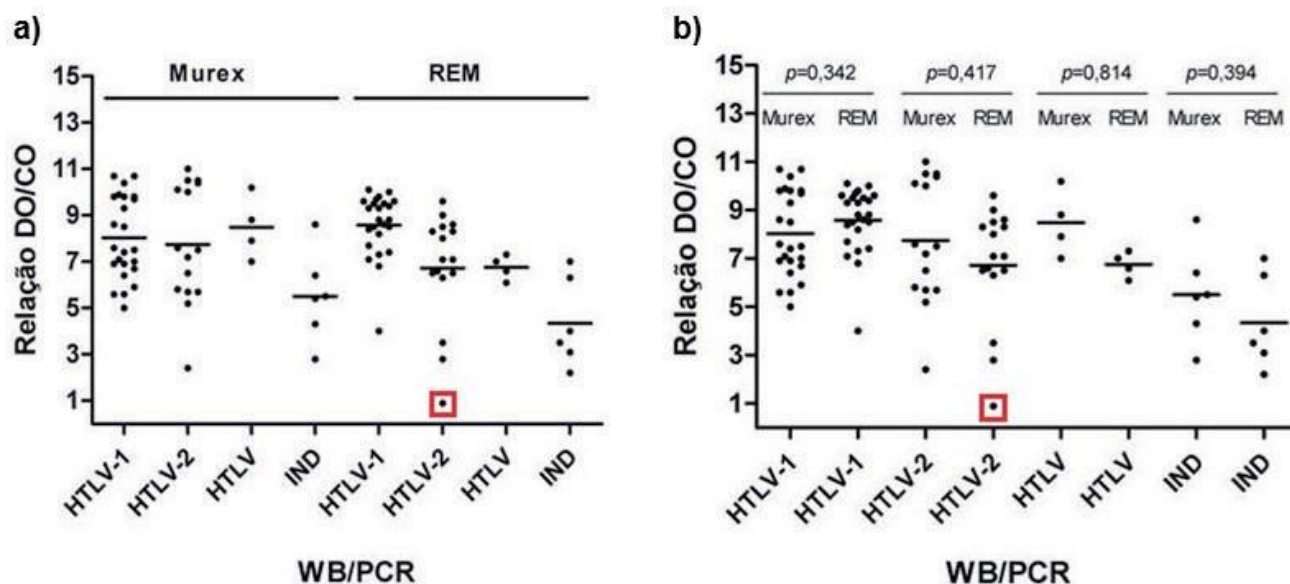


Figura. Resultados de DO/CO obtidos com os kits Murex e Gold ELISA dos casos de coinfeção HIV/HTLV em relação aos resultados de WB e PCR em tempo real pol para HTLV-1 e HTLV-2, usando GraphPad Prism e os programas estatísticos de Kruskal-Wallis ANOVA (a) ($p=0,0006$) e Mann-Whitney U-test (b)

Os resultados obtidos mostram que o kit Murex foi 100% sensível e 92% específico para detectar casos de infecção por HTLV-1/2 nesta casuística. Mostram também que o kit Gold ELISA deixaria de detectar um caso de infecção por HTLV-2 caso não fosse considerada a zona cinza. Estes resultados diferem parcialmente dos obtidos com amostras da rotina do Centro de Imunologia onde os dois kits se mostraram 100% sensíveis⁸, e confirmam a dificuldade de diagnóstico de infecção por HTLV-2 em população infectada pelo HIV. Apesar dos dois kits poderem ser utilizados isoladamente na triagem de infecção pelos HTLV-1/2, os resultados obtidos apontam para a necessidade de submeter amostras com resultados inconclusivos no EIA (zona cinza) aos testes confirmatórios de WB e/ou PCR.

Suporte

MS/SVS/DDAHV # BRAK57; DECIT/

SCTIE/MS, CNPq, FAPESP, SES-SP PPSUS #

2012/51220-8; FAPESP Bolsa IC para Carlos

Henrique Barreto Damiano # 2013/19775-2;

FAPESP Bolsa TT3 para Nadia Aparecida Costa

2014/15845-9; CNPq Bolsa PD2 para Adele

Caterino de Araujo # 303545/2012-7.

REFERÊNCIAS

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3, article 388.
2. Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(2): 182-6.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 de dez. 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e da outras providências].
4. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ,

-
- Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. Sensitivity of two ELISA tests in relation to western blot in detecting HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30 (3):173-82
5. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2007; 49(6): 361-4.
6. Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz. *Bepa – Bol Epidemiol Pauli*. 2008; 5(23): 12-8
7. Costa EAS, Magri MC, Caterino-de-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2011; 173:280-6.
8. Vilches TB, Kashino SS, Caterino-de-Araujo A. Avaliação de ensaio imunoenzimático de procedência nacional na pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2012; 22(2):27-8.

A criança febril sem causa aparente tem realmente uma virose?

Silvana Beres CASTRIGNANO

*Núcleo de Doenças Respiratórias – Centro de Virologia –
Instituto Adolfo Lutz*

Febre sem uma causa aparente é comum em crianças abaixo de três anos de idade. Embora infecção viral seja a suspeita principal na maioria dos casos, geralmente não são realizados testes para detecção de vírus. É importante que se invista na pesquisa para compreensão das causas dessa febre, e, se confirmado que na maioria dos casos a infecção é viral, talvez haja uma diminuição de tratamento de crianças febris com antibióticos de amplo espectro. A partir desta problemática, comum também no Brasil, um grupo de pesquisadores da Washington University School of Medicine, dos Estados Unidos da América, fez estudos bem delineados e abrangentes, utilizando técnicas diversas em amostras de pacientes com idades entre 2 a 36 meses, atendidos no pronto-socorro com temperatura maior ou igual a 38°C sem causa aparente e para os quais, por critérios clínicos, havia sido indicada coleta de sangue para exame laboratorial.

Em um dos artigos, amostras de sangue e de *swab* da nasofaringe foram testadas por um amplo painel de reações em cadeia pela polimerase (PCR) específicas para vírus¹. Foram dois os grupos controle da mesma faixa etária, um de crianças afebris submetidas a cirurgias ambulatoriais e outro de pacientes com febre e infecção bacteriana provável ou comprovada. A definição de positividade de uma criança para um vírus era o encontro do mesmo em sua amostra de sangue ou secreção nasofaríngea.

Os autores detectaram um ou mais vírus em 76% das 75 crianças com febre sem causa aparente, 40% de 15 crianças com febre e infecção bacteriana definida ou provável e 35% de 116 crianças afebris. Os vírus predominantes foram adenovírus, herpesvírus humano 6, enterovírus e parechovírus, que estavam presentes em 57% das crianças febris sem causa aparente, 13% das crianças com febre e infecção bacteriana definida ou provável e 7% das crianças afebris. Antibioticoterapia foi receitada para 51% das crianças com infecção viral e sem evidência de infecção bacteriana.

Outra abordagem do assunto foi feita através do estudo do viroma humano de crianças febris por causa desconhecida e afebris, analisando amostras de *swabs* nasofaríngeos e de plasma, totalizando 176 amostras². Utilizaram, para essa avaliação, a tecnologia de sequenciamento de nova geração (plataformas 454 e Illumina). Analisando os dados com ferramentas de bioinformática foi possível detectar 25 gêneros de vírus, incluindo achados esperados de alguns patógenos conhecidos como adenovírus, enterovírus e herpesvírus humanos 6 e 7, assim como vírus cuja patogenicidade é desconhecida. Também foram encontrados vírus inesperados, achado possibilitado pelas características da técnica, que é independente do conhecimento prévio de quais vírus poderiam estar naquela amostra. No entanto, técnicas de PCR específicas algumas vezes foram mais sensíveis

do que o sequenciamento de nova geração para detecção de um vírus em particular. Em média, as amostras de nasofaringe e de plasma de crianças febris tinham 1,5 a 5 vezes mais sequências virais, respectivamente, do que amostras de crianças afebris. As amostras de crianças febris também continham maior diversidade viral do que amostras de pacientes sem febre. E os dados indicaram que as maiores diferenças entre o viroma das crianças febris e afebris estavam nas amostras de plasma.

Um terceiro artigo avaliou a possibilidade de distinção entre infecção viral e bacteriana pela análise do perfil de expressão gênica dos leucócitos do sangue periférico, baseado no fato de que vírus e bactérias acionam programas transcricionais específicos da resposta imune do hospedeiro³. Foi utilizada técnica de *microarray* (microarranjos) para comparação de amostras de 30 crianças febris positivas para adenovírus, herpesvírus humano 6 ou enterovírus ou com infecção bacteriana aguda e 35 crianças afebris. Os resultados mostraram que o perfil transcricional distinguiu crianças com infecção bacteriana daquelas com infecção viral com melhor acurácia do que a contagem tradicional de glóbulos brancos no sangue periférico. Além disso, os perfis de expressão gênica diferenciaram crianças febris positivas para vírus tanto em relação aos controles assintomáticos infectados com o mesmo vírus quanto em relação às crianças afebris nas quais vírus não foram detectados.

Estudos que tratam de um assunto tão comum e que preocupa pediatras e pais no mundo todo — febre sem causa aparente em crianças jovens — merecem ser divulgados, ainda mais quando apresentam um bom desenho e avaliação de amplos parâmetros como no conjunto dos artigos aqui apresentados. Estes estudos investigaram presença de vírus por detecção específica (com PCR), estudo do viroma (com sequenciamento de nova geração) e a resposta imune do hospedeiro através do estudo do perfil transcricional (com *microarray*)

e compararam os resultados obtidos em grupos de pacientes com grupos controle. Os próprios autores citaram alguns vieses que podem ter existido em relação à seleção dos sujeitos das pesquisas e de suas amostras^{1,2,3}, mas que não diminuem a importância dos resultados. Os artigos ajudam a ampliar a visão sobre o assunto, incluindo a contribuição que o uso de novas tecnologias pode trazer. Os resultados mostraram que realmente é provável que muitos dos episódios de febre sem causa aparente nessa faixa etária sejam devidos a vírus, pois as crianças febris apresentaram maior positividade de vírus patogênicos e maior quantidade de sequências virais e diversidade viral em relação aos grupos controle. Os resultados também indicaram que a detecção de um vírus em uma criança febril não necessariamente prova ser o agente responsável pela doença; e que a decisão de suspensão de antibioticoterapia não pode ser feita com base unicamente no achado de um vírus, já que pacientes com doenças bacterianas podem ter vírus detectados concomitantemente em suas amostras biológicas, inclusive no sangue. Sem dúvida, os autores pavimentaram o caminho para que mais estudos sejam feitos com o fim de estabelecer a variedade de patógenos virais associados a febre nessas crianças pequenas, e a possibilidade de ajuda que o perfil transcricional poderá trazer na diferenciação entre infecções virais e bacterianas. Com a melhor compreensão do papel dos vírus na febre sem causa aparente haverá uma tendência à diminuição da prescrição desnecessária de antibióticos.

REFERÊNCIAS

1. Colvin JM, Muenzer JT, Jaffe DM, Smason A, Deych E, Shannon WD, et al. Detection of viruses in young children with fever without an apparent source. *Pediatrics*. 2012; 130(6):e1445-62.
2. Wylie KM, Mihindukulasuriya KA, Sodergren E, Weinstock GM, Storch GA. Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PLoS One*. 2012; 7(6):e27735.
3. Hu X, Yu J, Crosby SD, Storch GA. Gene expression profiles in febrile children with defined viral and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(31):12792-7.

Estudo retrospectivo da qualidade microbiológica e físico-química da água de soluções alternativas de abastecimento na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no período de 2008 a 2014

Adriana Henriques VIEIRA¹, Ana Carolina Buchalla ALONSO¹, Ana Ruth Pereira de MELLO¹, Cícero Vágner de SOUSA¹, Eduardo GONZALEZ¹, Estevão de Camargo PASSOS¹, Guilherme Sampaio ROXO¹, Mário TAVARES¹, Roberto Carlos Fernandes BARSOTTI¹, Regina Célia PASCHOAL¹, Fernanda Garrido GONÇALVES²

¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Santos-Instituto Adolfo Lutz

²Bolsista do Programa de Aprimoramento Profissional

A água oriunda das soluções alternativas coletivas e as individuais, não é rotineiramente monitorada quanto à qualidade mas pode se alterar por estar em contato direto com o meio ambiente e, muitas vezes, não ter nenhum tratamento preventivo. Logo, pode representar risco à saúde dos consumidores.

Na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS), Estado de São Paulo, observam-se deficiências nos dados disponíveis quanto a cadastro de bicas e de poços destinados ou utilizados para abastecimento público¹, e à qualidade de suas águas. “Em vista disso, este trabalho apresenta...” um estudo retrospectivo da qualidade da água de bicas, nascentes e poços localizados nos nove municípios da citada região, no período de outubro de 2008 a julho de 2014. Foram analisadas 305 amostras no Centro de Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz (IAL), sendo 273 (90%) relacionadas a análises solicitadas por empresas ou particulares mediante taxa paga e 32 (10%) por demanda das Vigilâncias Sanitárias municipais.

Relativamente às análises em água de poços,

os solicitantes não informaram se a finalidade das requisições era atender a norma paulista que dispensa a outorga para uso de recursos hídricos superficiais e subterrâneos². Uma das obrigações do usuário é apresentar comprovante da qualidade bacteriológica e físico-química da água bruta, de acordo com determinados parâmetros estabelecidos pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (MS)³.

Os parâmetros avaliados foram basicamente os previstos na norma acima citada²: coliformes totais e termotolerantes (*Escherichia coli*), pela técnica do substrato definido (Colilert®, descrita na metodologia da APHA (2005); cloreto, cloro residual livre e fluoreto (nas águas tratadas); cor aparente, dureza total, ferro, nitrato, nitrito, odor, pH, sólidos totais dissolvidos, sulfato e turbidez, segundo as normas analíticas do IAL”⁴. Somente o ensaio para amônia não foi analisado por razões técnicas.

Do total de 305 amostras analisadas, 84 (28%) foram reprovadas, com base nas Portarias 518/2004 ou 2914/2011 do MS, que revogou a primeira³. Os ensaios com maior percentual de resultados insatisfatórios em relação ao total de amostras analisadas foram: cor aparente, *E. coli* e ferro, conforme a Figura 1.

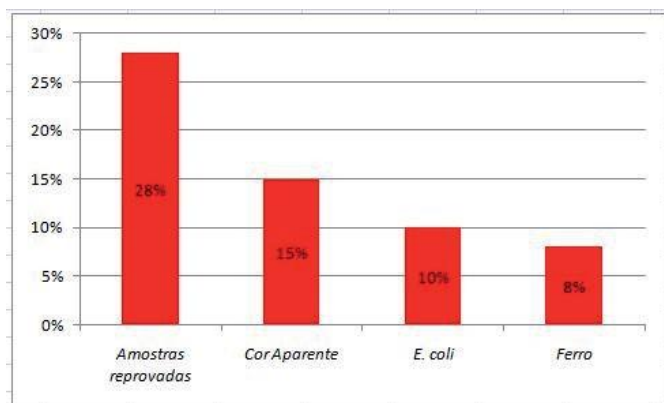


Figura 1. Percentual de amostras reprovadas e ensaios com maiores percentuais de resultados insatisfatórios em relação à totalidade de amostras analisadas

Deve ser ressaltado que a cor é um parâmetro estético (podendo afetar a aceitabilidade do consumidor) mas valores elevados podem indicar qualidade inadequada da água, uma vez que a cor pode ser originada da presença de íons metálicos naturais (ferro e manganês, por exemplo), substâncias húmicas, plâncton, etc, e também de resíduos industriais.

Foram encontrados alguns valores bem elevados, sendo o maior de 210, isto é, 14 vezes acima do limite legal (15 Unidades Hazen)³, verificado em 2009, para amostra de água de um poço particular situado no Guarujá.

O ferro, se presente em altos níveis em águas subterrâneas, como a de poços, constitui-se também em problema estético, tornando a água amarelada e com sabor estranho, inviabilizando seu uso doméstico e industrial. Os valores insatisfatórios não estiveram muito superiores ao máximo estabelecido (0,3 mg/L)³, porém a água de um poço particular, localizado em Itanhaém, atingiu 5,1 (em 2014), ou seja, 17 vezes superior ao mencionado limite.

Os coliformes totais não são patogênicos, porém indicam possível presença de dejetos animais e humanos na água, a ser confirmada pela pesquisa de *E. coli*. Estiveram presentes junto com outro(s) parâmetro(s) com resultado insatisfatório em 33 (11%) das amostras, sendo que isoladamente em

16 (5%) das mesmas. No entanto, estes resultados são considerados satisfatórios, pois se trata de um ensaio preliminar ao da pesquisa de *E. coli*, com a legislação prevendo ações corretivas e a coleta de novas amostras para a realização de análises até que se revelem satisfatórios³.

Já a presença de *E. coli* ocorreu tanto em águas de bicas, coletadas apenas em Santos, como em água de poços de vários municípios da RMBS, sendo as amostras oriundas de particulares ou encaminhadas pela Vigilância Sanitária.

Considerando o exposto, sugere-se um monitoramento constante da qualidade das águas de soluções alternativas de abastecimento por parte da Vigilância Sanitária nos municípios ora monitorados.

AGRADECIMENTOS

A Ricardo Luis de Souza, Técnico de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica - Informática, do IAL – Centro de Laboratório Regional de Santos, pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Comitê da Bacia Hidrográfica da Baixada Santista (CBH-BS). *Plano de Bacia Hidrográfica 2008-2011 – Relatório Síntese fevereiro/2009*. CBH-BS, 42p.
2. São Paulo. Leis, decretos, etc. Portaria DAEE nº 2292, de 14 de dezembro de 2006. Aprova a Norma que disciplina os usos que independem de outorga de recursos hídricos superficiais e subterrâneos no estado de São Paulo, no art. 1º do Decreto Estadual nº 41.258/96, com redação dada pelo Decreto Estadual nº 50.667/06. Disponível em: http://www.daee.sp.gov.br/legislacao/arquivos/700/Portaria%20DAEE%202292_RetiRati%2003%2008%2012.pdf. Acesso em: 29/09/2014.
3. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acesso em: 13/05/2013.
4. Scorsafava, M.A. *et al.* Águas. In: Zenebon, O.; Pascuet, N.S. coord. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4a. ed. Brasília, Ministério da Saúde, ANVISA, 2005:345-404.

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase na icterícia neonatal: avaliação de 10 anos do Instituto Adolfo Lutz-SP

Marilena OSHIRO; Vânia Maria CAÇÃO; Cristiani Martinez SALZONE

Núcleo de Hematologia e Bioquímica -Centro de Patologia- Instituto Adolfo Lutz

No período neonatal, a icterícia presente após 24 horas do nascimento com bilirrubina total máxima até 12mg/dL é considerada fisiológica, refletindo uma adaptação neonatal ao metabolismo da bilirrubina. Porém, quando a icterícia surge antes das 24 horas ou os valores de bilirrubinas totais apresentam acima de 12mg/dL é um alerta para investigação de processos patológicos. Uma das causas da hiperbilirrubinemia indireta patológicas em recém-nascidos (RNs) é a deficiência da glicose -6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), uma enzima que tem a função de proteger os glóbulos vermelhos frente aos danos provocados por estresse oxidativo, os responsáveis pela redução da vida média dos eritrócitos.

A deficiência de G-6-PD é a enzimopatia eritrocitária mais comum da humanidade, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. A grande maioria dos indivíduos afetados é assintomática. No entanto, eles correm o risco de ter uma grave anemia hemolítica aguda após exposição ao estresse oxidante induzido por alguns fármacos ou produtos químicos, por processos infecciosos ou pelo consumo da fava *Vicia faba*.

No período neonatal, a complicação mais

severa que a deficiência de G-6-PD pode causar é a encefalopatia bilirrubínica crônica (EBC) ou kernicterus que pode agravar para uma paralisia cerebral do tipo atetóide ou ao óbito. Nos últimos anos, vários países tem relatado alta incidência desta deficiência nos casos de kernicterus. No Brasil, é estimado que aproximadamente 1,9 milhões de brasileiros possam desenvolver icterícia neonatal grave, com risco de kernicterus, associado à deficiência de G-6-PD¹.

Através de dados secundários, originários das informações dos registros internos do Núcleo de Hematologia e Bioquímica do Instituto Adolfo Lutz – SP, foi estimada a prevalência da deficiência da G-6-PD nos casos de investigação de icterícia neonatal, no período de janeiro de 2004 até julho de 2014. As procedências das solicitações para análise da atividade da G-6-PD eram somente dos hospitais e ou maternidades da cidade de São Paulo. Foram incluídos neste levantamento apenas neonatos, ou seja, crianças com até 28 dias de vida. O método utilizado para a determinação quantitativa da atividade da G-6-PD utilizado no laboratório é baseado na oxidação da glicose-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogliconato (6-PGA) e na redução do NADP

a NADPH, analisado por espectrofotometria no comprimento de onda a 340nm, conforme protocolo publicado por Beutler em 1984. Foi definido como deficientes os neonatos que apresentavam atividades enzimáticas para G-6-PD $\leq 7,0$ UI/gHb, representando 50% do valor de referência do método utilizado. Para os recém-nascidos femininos com atividades intermediárias, ou seja, suspeito genotipicamente como heterozigotos, atividades entre 7,1 e 13,1 UI/gHb sendo o limite superior baseado em 60% da atividade do grupo de RNs normais (21,9 UI/gHb).

Foram avaliados 141 RNs masculinos e 122 RNs femininos. No grupo do sexo masculino foram encontrados 37 com deficiência da G-6-PD, representando 26,2 % entre os 141 investigados. Dos 122 RNs femininos, 8 (6,6%) apresentaram atividade abaixo de 7,0 UI/gHb e 15 (12,3%) expressaram atividades intermediárias, totalizando 23 (18,9%) com a enzimopatia.

O gene da G-6-PD está localizado no cromossomo X e, portanto a deficiência é ligada ao sexo. Por esta razão, o defeito é totalmente expresso nos homens afetados e nunca é transmitido de pai para o filho (homem), mas sim, de mãe para filho. Apresentam atividades enzimáticas bem definidas. Neste estudo, a maioria dos deficientes apresentaram menos do que 20% da atividade enzimática do grupo de RN masculino normal. A média desta atividade no grupo de RNs do sexo masculino classificado como deficientes foi de 1,7 UI/gHb, representando somente 7,7% da atividade do grupo de RNs masculinos normais (21,9 UI/gHb). Já, nas mulheres deficientes, a média da atividade foi de 3,58 UI/gHb. As intermediárias apresentaram uma média de 11,47 UI/gHb com intervalo entre 7,6 e 13,1 UI/gHb.

A dificuldade de diagnóstico desta enzimopatia está nas mulheres heterozigotas. Nesta condição, um dos cromossomos X pode ser inativado aleatoriamente (hipótese de Lyon),

provocando o surgimento de duas populações de glóbulos vermelhos, células deficientes e células normais², com proporções bastante variadas entre elas. Este fenômeno pode resultar em atividades enzimáticas residuais que vão desde 30% a 60%, o que leva a uma expressão fenotípica bastante variável. A probabilidade de ter resultados falsos negativos é muito maior do que resultados falsos positivos. Cerca de 10% de heterozigoto feminino tem atividade normal da G6PD, 10% têm atividade baixa e outros 80% tem atividade intermediária ou “borderline”³.

Vale a pena ressaltar que, não só neste trabalho como numa investigação de diagnóstico, as RNs classificadas como intermediárias devem ser consideradas apenas como suspeitas até que se tenha a confirmação da mutação por avaliação molecular. É preciso ainda, lembrar que os eritrócitos jovens ou reticulócitos possuem expressão maior da atividade enzimática da G-6-PD comparada com as células senis. Nos RNs é normal encontrar reticulócitos em torno de 6%, o qual pode superestimar a atividade real. E que também, podem existir patologias associadas que agravam a sintomatologia, por exemplo, a Síndrome de Gilbert.

Todos os RNs incluídos neste estudo tinham icterícia sem definição da causa. A determinação da atividade da G-6-PD é um exame, na sua maioria, solicitado somente após a exclusão de causas mais frequentes como as imunológicas e infecciosas. A prevalência estimada da deficiência de G-6-PD encontrada neste estudo foi de 22,81%, incluindo os RNs do sexo feminino intermediários. É um índice elevado comparado com outros estudos relacionados com bilirrubinemia na população brasileira. Em Natal/RN foi encontrado uma frequência de 2% nos RNs ictéricos. No Rio Grande do Sul, prevalência de 4,6% nos RNs conduzidos à fototerapia. Neste mesmo estado, em Porto Alegre, 8,7% dos pacientes com icterícia, incluindo indivíduos com 1 dia de vida até 82 anos de idade tinham a enzimopatia.

Prevalências mais elevadas nos RNs são relatadas nos países como Paquistão com 15%, Turquia com 18% ou Taiwan com 24%.

Do exposto, pode-se concluir que, apesar de ser uma estimativa, a prevalência apresentada para a deficiência da G-6-PD nos RNs ictéricos é alta, podendo ser considerado um problema de saúde pública.

Chamamos atenção especial das autoridades públicas de saúde brasileira no sentido de avaliar a exigência da pesquisa da atividade da G-6-PD em todos os recém-nascidos. Com esta medida, o Brasil estaria acatando a recomendação da Organização Mundial da Saúde, que se recomenda a triagem neonatal desta enzimopatia nos países que apresentam uma prevalência acima de 5% na

população masculina⁴. No Brasil esta prevalência é em torno de 10% na população negroide.

REFERÊNCIAS

1. Leite AA. Icterícia neonatal e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010; 32(6):430-431.
2. Algur N, Avraham I, Hammerman C, Kaplan M. Quantitative Neonatal Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Screening: Distribution, Reference Values, and Classification by Phenotype. *J Pediatric.* 2012; 161(2):197-200.
3. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and severe neonatal hyperbilirubinemia: a complexity of interactions between genes and environment. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010; 15:148-156.
4. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ.* 1989; 67(6):601-611.

Diversidade de isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* por *Multi-locus sequence typing* no Estado de São Paulo

Lucas Xavier BONFIETTI¹, Cau PHAM², Dayane Cristina SILVA³, Marilena dos Anjos MARTINS³, Shawn LOCKHART², Marcia de Souza Carvalho MELHEM³

¹Núcleo de Ciências Biomédicas-CLR Araçatuba-Instituto Adolfo Lutz

²CDC, Centers for Disease Control and Prevention - Atlanta, GA, EUA;

³Núcleo de Micologia-Centro de Parasitologia e Micologia-Instituto Adolfo Lutz

Levaduras do gênero *Cryptococcus* apresentam comportamento ubíquo e são responsáveis por causar infecções em mamíferos, especialmente em seres humanos. A criptococose é uma micose sistêmica, causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, que se distribui mundialmente e apresenta caráter endêmico no Nordeste do Brasil. A apresentação clínica da doença pode variar desde quadro pulmonar assintomático até meningoencefalite grave, podendo levar ao óbito a depender de fatores, como: carga fúngica inicial, imunidade do paciente e espécie do agente etiológico¹²

Até a década passada, acreditava-se que *Cryptococcus neoformans* era uma única espécie subdividida em quatro sorotipos A, D (*C. neoformans* var *neoformans* e var. *grubii*) B, C (*C. neoformans* var *gattii*), e um híbrido AD. Através da diferenciação fenotípica e genotípica esses agentes foram divididos em duas espécies: *C. neoformans* e *C. gattii*⁷. Posteriormente, Meyer e colaboradores em 1999 e 2003, por metodologias de DNA-Fingerprinting e PCR-RFLP, subdividiram as

espécies *C. gattii* e *C. neoformans* em quatro subtipos cada: VGI - VGIV e VNI - VNIV^{10,11}. As variáveis descritas apresentam semelhanças aos sorotipos descritos previamente, no entanto, sem total equivalência. Meyer e colaboradores (2009)⁹, a fim de uniformizar os métodos moleculares utilizados e para melhor compreender a epidemiologia dessa doença, publicaram um consenso sobre *Multi-locus sequence typing* (MLST) e *Cryptococcus*. As ferramentas moleculares levaram à análise mais precisa dos subtipos e permitiram associações com virulência, perfis de resistência e distribuição geográfica^{1,2,4,5,6,9 e 13}.

O objetivo desse trabalho foi estudar isolados clínicos de *C. gattii* no estado de São Paulo com vistas a aprimorar o conhecimento sobre a diversidade genética desse agente.

Em colaboração com Centers for Disease Control and Prevention (CDC-Atlanta, GA, EUA) foram analisados por técnica de MLST, 56 isolados clínicos de *C. gattii* (sendo isolado 1 por paciente) obtidos da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, abrangendo o período de 1994-

2012. Os isolados foram purificados e plaqueados em ágar de extrato de levedura-peptona dextrose (YPD) adicionados de 0,5% de NaCl a partir das culturas liofilizadas. Os DNAs foram extraídos usando-se *kit* UltraClean (MO BIO Laboratories). A técnica molecular de MLST utilizando os genes dos *loci* 7 (CAP59, URA5, IGS1, PLB1, SOD1, GPD1, LAC1) foi realizada de acordo com o respectivo Consenso, assim como o sequenciamento dos 7 genes utilizando “Big Dye terminator”⁹. Os resultados foram comparados no banco de dados (<http://mlst.mycologylab.org>). Os produtos do sequenciamento foram compilados e analisados nos programas *BioEdit* e *Sequencher*. A árvore filogenética foi construída utilizando-se o programa MEGA 5.0.

Foram observadas mutações correspondendo a novos alelos nos genótipos VGI e VGII foram observadas. Para o tipo molecular VGI, ainda que, apenas 4 isolados tenham sido estudados, um novo alelo foi observado para o gene SOD. Para o tipo molecular VGII, foram observados 12 alelos inéditos, que não estavam presentes no banco de dados do MLST. Dentre estes, foram identificados 4 novos alelos para o gene IGS1, 3 novos alelos para o gene CAP59, 2 novos alelos para PIB 1 e SOD1 e um novo alelo para PLB1. Não foram encontrados novos alelos para os genes LAC1 e URA5.

Dos 56 isolados compreendidos nesse estudo, 21 (37,5%) apresentaram STs que, até então, não estavam incluídos nas bases de dados (ST300-319 e ST325), sendo que, a configuração de um novo ST pode ser gerada por novos alelos ou por uma nova combinação de alelos, previamente, conhecidos.

Foram identificados 3 grandes grupos, sendo um deles de isolados VGI (4 isolados) e 2 grupos VGII (7 e 47 isolados). Os resultados deste estudo demonstraram grande diversidade de STs, ao contrário dos encontrados em estudos realizados na Austrália e EUA, os quais indicaram baixa diversidade molecular, com grande número de cepas clonais dentre os entre isolados de *C. gattii* VGII^{3,5 8}. Os grupos clonais englobados no genótipo VGII descritos no estudo norte-americano foram subdivididos em VII *a*, *b* e *c*, dos quais apenas VGII *b* foi descrito em amostras provenientes da Austrália^{3,5}. A análise filogenética dos isolados analisados neste estudo revelou um único isolado clonal de VGII *a* e apenas isolados com perfis genéticos similares aos de VGII *b* e *c*. Apesar da ausência de genótipos VGII *b* e *c*, perfis moleculares semelhantes foram encontrados em isolados deste estudo.

Na figura 1 pode ser observada a árvore filogenética de todos os isolados, comparados com amostras-padrão dos genótipos já conhecidos VGII *a*, *b* e *c*. Grande diversidade genética na América do Sul foi, também, observada por Fraser e colaboradores que, embora estudando número menor de isolados, observaram alta heterogeneidade dentre os genótipos, com todos os perfis moleculares distintos entre si (7/7, 100%)⁵.

Este é o primeiro relato da ocorrência de um subtipo molecular com características de VGIIc na América do Sul. O estudo mostrou, ainda, grande diversidade genotípica entre isolados de *C. gattii* no Estado de São Paulo. A correlação desses achados com fatores de virulência e resistência a antifúngicos motivam futuros estudos que contribuam para o conhecimento de um principais agentes da criptococose e sua importância clínica.

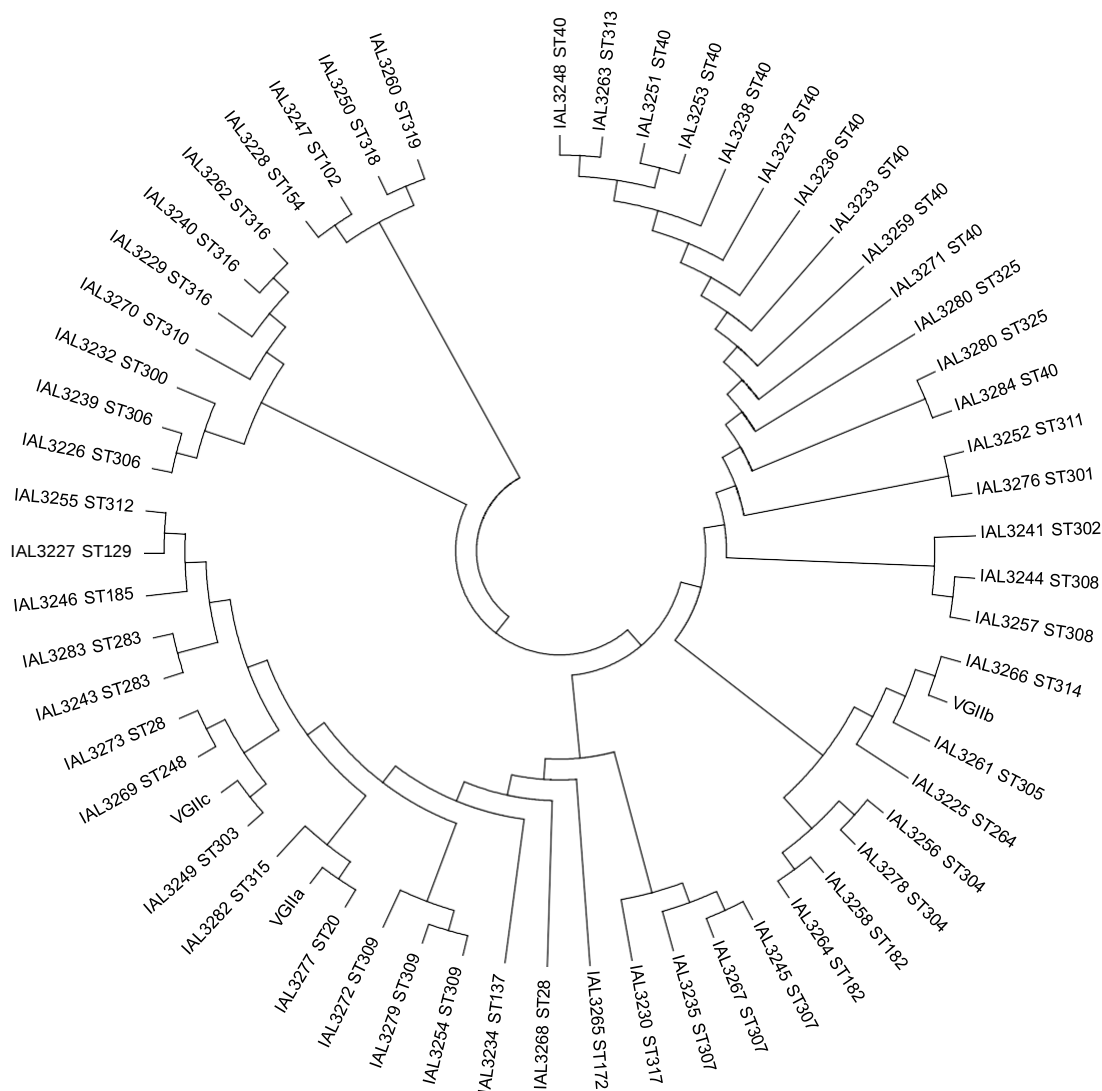


Figura 1. Árvore filogenética de 56 isolados clínicos de *C. gattii* e amostras-padrão de genótipos VGIIa, b e c (nos círculos)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boekhout T, Theelen B, Diaz M. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiol 2001; 147:891–907
- Byrnes EJ, LI W, Lewit Y. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. PLoS Pathog 2010, 6:e1000850.
- Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, Ellis D, Malik R, van de Wiele N, et al. Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population—an emerging outbreak in Australia. PLoS One 2011, 6:e16936.
- Datta K, Bartlett KH, Marr KA *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009: 17258–17263.
- Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. Nature 2005, 437:1360–1364.
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis

-
- outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:17258–63.
7. Kwon-Chung, K. J. and Varma, A., Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. *FEMS Yeast Research* 2006, 6:574–587.
 8. Lockhart SR. Epidemiological cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, 73:144–148.
 9. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 2009, 12:1–14.
 10. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999, 20:1790–9.
 11. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003, 9:189–95.
 12. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010, 50:291–322.
 13. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol* 2012, 50:328–32.

Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica

Juliana Possatto TAKAHASHI¹, Marcia de Souza Carvalho MELHEM²

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Coordenadoria de Controle de Doenças-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

²Núcleo e micologia – Centro de Parasitologia e Micologia-Instituto Adolfo Lutz

Os compostos azólicos são substâncias químicas usadas na prática médica para tratamento de infecções fúngicas e, também, utilizadas como fungicidas na agricultura¹. Na década de 90, a resistência adquirida aos fármacos azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, etc.) era incomum em leveduras. Desde então, é crescente o número de citações sobre ocorrência de cepas resistentes a um, ou mais, desses medicamentos. As razões para a emergência desse fenômeno com grande implicação clínica são apenas, parcialmente, conhecidas. Dentre as hipóteses mais plausíveis estão aquelas relacionadas ao uso frequente de fluconazol em esquemas profiláticos, pré-emptivos ou terapêuticos. De modo similar, o uso amplo de fungicidas agrícolas poderia exercer pressão seletiva em isolados fúngicos presentes no meio ambiente exposto a esses compostos.

Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Em 2010, o consumo de agrotóxicos no Brasil teve acréscimo no ano de 190% e os fungicidas corresponderam 14% nesse mercado². De acordo com a FAO (2008)³, o consumo de fungicidas

atingiu uma área potencial de, aproximadamente, 800 mil hectares. Os números apontam o uso amplo de ingredientes ativos como fungicidas em áreas de plantação de hortaliças no Brasil, podendo ser 8 a 16 vezes maior nessa produção do que o utilizado na cultura da soja. Isso indica que, cerca de 20% da comercialização de fungicidas no Brasil destinam-se ao uso em plantações de hortaliças consumidas pela população⁴. O aumento do uso de agrotóxicos na agricultura causa contaminação residual do solo com esses produtos. Quando os agrotóxicos são aplicados, existe a possibilidade dessas substâncias químicas exercerem alguns efeitos em micro-organismos não necessariamente aqueles para os quais foi destinada a sua aplicação, inclusive aqueles da microbiota de solo⁵. A exposição ambiental a componentes azólicos abre caminho para a seleção e multiplicação de fungos resistentes a esses compostos⁶. Assim, isolados resistentes podem ser inalados ou ingeridos ou, ainda, introduzidos por traumatismos em indivíduos que trabalham em plantações ou vivem próximo a essas áreas. Desse modo, poderiam ser justificadas muitas infecções causadas por cepas resistentes a tratamento antifúngico com fármacos azólicos. De modo

curioso, a transmissão pessoa a pessoa de cepas com reduzida sensibilidade ao fluconazol, durante tratamento médico, é praticamente impossível, de modo a apoiar a hipótese da seleção ambiental de cepas resistentes pós-exposição a compostos azólicos.

Alguns estudos mostraram correlação entre cepas ambientais e clínicas, tendo os dois grupos de cepas o mesmo perfil de resistência a compostos azólicos. Em particular, cepas de *Aspergillus* spp., fungo filamentoso amplamente distribuído em meio ambiente possuem resistência cruzada (a ambos: fármacos e fungicidas azólicos) e esse fato impacta o tratamento de pacientes com aspergilose bronco pulmonar alérgica ou outras formas de aspergilose^{7,8,9} Por estas razões a avaliação contínua da ocorrência de fungos em locais submetidos à aspersão de fungicidas, que apresentem fenótipos resistentes a compostos azólicos e, ainda, a busca da origem dessa resistência são procedimentos relevantes para a epidemiologia da resistência clínica nas micoses muco-cutâneas e invasivas. Contribuir para o conhecimento da microbiota de meio ambiente agrícola pode gerar subsídios para medidas preventivas de âmbito clínico e condutas terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trösken ER, Adamska M, Arand M, Zarn JA, Patten C, Völkel W, Lutz WK. Comparison of lanosterol-14 α -demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles. *Toxicology*. 2006; 228(1): 24-32.
2. SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas; Anais do Workshop: Mercado Brasileiro de Fitossanitários; Avaliação da Exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores de Agrotóxicos. Brasília: 28/04/2009
3. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAOSTAT. Database Results. [on line]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.
4. Almeida VES, Carneiro FF, Vilela NJ. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socioambientais e políticas públicas para promoção da saúde. *Tempus Actas de Saúde Coletiva*. 2009; 3(4):84-99.
5. Wardle DA, Parkinson D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil*. 1990; 122: 21-28.
6. Yang YL, Lin CC, Chang TP, Lauderdale TL, Chen HT, Lee CF, et al. Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. *PloS one*. 2012; 7(4): e34609.
7. Snelders E, Huis in't Veld RA, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(2):4053-4057.
8. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?. *The Lancet infectious diseases*. 2009; 9(12): 789-795.
9. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup, MC. (2010). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(11): 4545-4549.

Qualidade microbiológica da água para consumo humano na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no biênio 2011-2012

Estevão de Camargo PASSOS¹, Ana Ruth Pereira de MELLO¹, Cícero Vagner de SOUSA¹, Caroline Fariñas de SOUZA*, Milena Karine de Souza OLIVEIRA*, Fernanda Garrido GONÇALVES **, Ana Luiza Soares de FREITAS*, Tatiana Caldas PEREIRA¹

¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas-CLR Santos-Instituto Adolfo Lutz.

*Programa de Aprimoramento Profissional (PAP)

**Bolsista FAPESP

A Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde¹ dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, com intuito de oferecer a população uma água de boa qualidade destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, que não ofereça risco à saúde humana.

A Região Metropolitana da Baixada Santista é constituída pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, com uma população fixa superior a 1.600.000 habitantes, a qual chega a triplicar no verão devido ao turismo. O Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano – PROÁGUA instituído em 1992, no Estado de São Paulo, é coordenado pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVS) da Secretaria de Estado da Saúde, por meio do Grupo de Vigilância Sanitária (GVS) de cada região administrativa. O GVS-XXV atua na Baixada Santista em conjunto as Vigilâncias Sanitárias (VISA) municipais e o Centro de

Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz (CLR Santos/IAL).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica da água para consumo humano na Região Metropolitana da Baixada Santista, no biênio 2011-2012, a coleta das amostras foi realizada pelas equipes da Vigilância Sanitária municipais, cabendo aos fiscais a dosagem de cloro residual livre (CRL) e a medição do pH e da temperatura da água.

As análises de água para consumo humano foram verificadas quanto aos parâmetros microbiológicos estabelecidos pela Portaria nº 2.914/2011¹ e os ensaios foram realizados no Centro de Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz. Os parâmetros microbiológicos avaliados foram presença de coliformes totais e *Escherichia coli* de acordo com o “Standard Methods for Examination of Water and Wasterwater” 2005².

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas das amostras de água estão descritos na tabela 1. No período de janeiro de 2011

a dezembro de 2012 foram analisadas um total de 3.519 amostras de água da região da Baixada Santista; provenientes dos municípios de Bertioga, Cubatão ; Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, verificou-se a presença de coliformes totais em 425 amostras, como descrito na tabela 1. Segundo a Portaria nº 2.914/2011 a presença da *Escherichia coli* na água de consumo humano indica que a amostra é considerada insatisfatória, foram observadas 23 amostras positivas para esta bactéria, o município de Bertioga apresentou 2 amostras (8,6%), Cubatão 3 (13,0%), Mongaguá 1 (4,3%), Praia Grande 3 (13,0%), Santos 6 (26,0%) e São Vicente 8 (34,7%). Os municípios de Guarujá, Itanhaém e Peruíbe não apresentaram amostras insatisfatórias.

Os resultados obtidos mostraram que, do total de 3.519 amostras analisadas, 23 (0,6%) foram consideradas insatisfatória pela presença de *E. coli*, outras 425 (12%) apresentaram coliformes totais consideradas satisfatórias de acordo com a legislação em vigor.

A presença de coliformes totais em amostras de água na saída do tratamento é considerada insatisfatória de acordo com a Portaria nº 2.914/2011, porém, a observação destes microrganismos na água coletada na rede de abastecimento público não é considerada insatisfatória.

Saliente-se que a comparação dos resultados obtidos nas amostras condenadas pela presença de coliformes termotolerantes/*Escherichia coli* no biênio 2005-2006³ foram 190 amostras (6,1%), em 2007-2008⁴ 147 amostras (4,7%), e em 2009-2010⁵ 175 amostras (5%), observou-se que, no biênio 2011-2012 houve uma redução para 23 (0,6%) das amostras insatisfatórias.

Os dados obtidos demonstram que neste biênio (2011-2012) o Programa PROÁGUA na Região Metropolitana da Baixada Santista está sendo eficaz no que diz respeito a oferta da qualidade da água para a população e a sua manutenção bem como a importância da participação dos Laboratórios de Saúde Pública com as Vigilâncias Sanitárias (VISAs) municipais.

Tabela 1. Amostras de águas provenientes do PROÁGUA da região metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no biênio 2011-2012, com resultados em desacordo com a legislação em vigor segundo os municípios e parâmetros microbiológicos

Município	Amostras analisadas	Coliformes totais	Amostras insatisfatórias
			<i>Escherichia coli</i>
Bertioga	412 (11,7%)	33 (7,7%)	2 (0,4%)
Cubatão	291 (8,2%)	36 (8,4%)	3 (1,0%)
Guarujá	587 (16,6%)	80 (18,8%)	0
Itanhaém	367 (10,4%)	27 (6,4%)	0
Mongaguá	176 (5,0%)	48 (11,2%)	1 (0,5%)
Peruíbe	272 (7,7%)	37 (8,7%)	0
Praia Grande	382 (10,8%)	51 (12,0%)	3 (0,7%)
Santos	670 (19,0%)	67 (15,7%)	6 (0,8%)
São Vicente	362 (10,2%)	46 (10,8%)	8 (2,2%)
TOTAL	3519	425 (12,0%)	23 (0,6%)

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria n. 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 14 de dezembro de 2011, nº 239, Seção 1, p. 39-46.
2. American Public Health Association (APHA). Standard methods for examination of water and wastewater. 20th ed., Washington, APHA, 2005.
3. Mello ARP, Souza CV, Gonzalez E, Passos EC, Faustino JS, Jorge LIF, et al. Avaliação da qualidade de água para consumo humano na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no biênio 2005-2006. Bol Inst Adolfo Lutz. 2007; 17(1/2): 62-64.
4. Passos EC, Mello ARP, Souza CV, Gonzalez E, Jorge LIF, Silva MLP, et al. Avaliação microbiológica e físico-química da qualidade das águas para consumo humano realizada na região metropolitana da Baixada Santista, no período de 2007-2008. Bol Inst Adolfo Lutz. 2012; 22(1): 22-24.
5. Tavares M, Passos EC, Barsotti RCF, Gonzalez E, Mello ARP, Souza CV, et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da água para consumo humano na região metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no biênio de 2009-2010. Bol Inst Adolfo Lutz. 2011; 22(2): 53-55.

O uso do ácido glioXílico em formulações cosméticas

Maria Cristina SANTA BÁRBARA, Ligia Luriko MIYAMARU, Fumiko KODAÍRA.

Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes-Centro de Medicamentos Cosméticos e Saneantes-Instituto Adolfo Lutz

O ácido glioXílico ou ácido formilfórmico é um ácido orgânico de fórmula $C_2H_2O_3$, é o mais simples dos aldeídos, conhecido como liberador de formaldeído em altas temperaturas. Existem poucos relatos na literatura com relação à sua decomposição; estudos realizados em amostra padrão, temperaturas até 200 °C por GC/MS – SPME nos limites de detecção do equipamento de 1×10^{-9} concluiu que não foi possível quantificar o formol identificado durante o processo de decomposição¹; em outro estudo foi quantificada a formação de formaldeído em quantidades equivalentes a existente no ar². A NR15 – Portaria 3214/78, estabelece limites de formaldeído no ar abaixo de 1,6 ppm e da Legislação de conservante em produtos cosméticos permite o uso de até 0,2% p/p³. O mercado brasileiro vem utilizando o ácido glioXílico como alternativa segura ao uso formaldeído em produtos que têm como finalidade alisamento/relaxamento dos cabelos. O alisamento do cabelo utilizando o ácido glioXílico não ocorre pela reação entre o formaldeído liberado e o cabelo, e sim pela reação entre o ácido e a estrutura dos aminoácidos através do processo de

desnaturação da proteína, reação entre o radical aldeídico com os grupamentos amínicos e as pontes de dissulfeto, que após enxágue e associado ao calor da chapinha (180° a 230°C), originando uma estrutura bio-polimerizada, conferindo o efeito de alisamento⁴. A ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária informa que os produtos que utilizam o ácido glioXílico com a finalidade de alisamento/relaxamento dos cabelos estão irregulares e ainda não existe uma regulamentação para seu uso como princípio ativo. Os fabricantes de produtos a base de ácido glioXílico, não descrevem na formulação que este tem a finalidade de alisar ou relaxar os cabelos e sendo utilizado em concentrações que variam de 10 a 20% p/p como regulador de pH; o produto acabado apresenta pH abaixo de 2,0 e está notificado na ANVISA como risco 1⁵, ou seja, produto considerado de potencial de baixo risco. Outro grande problema dos produtos a base de ácido glioXílico é a adição de formaldeído em sua composição, pois os dois são aldeídos e impossibilita a quantificação de formaldeído pelo método de sulfito; identificando apenas a presença de formaldeído.

O objetivo deste estudo foi avaliar os produtos para cabelos denominados como escovas progressivas ou térmicas notificadas na ANVISA como risco I (possuem propriedades básicas ou elementares, que não necessitam comprovar sua eficácia, ou seja, produtos com baixo potencial de risco); encaminhadas para análise no Instituto Adolfo Lutz no período de janeiro de 2013 a julho de 2014, quanto ao ensaio de pH, a presença do ácido glioxílico e a adição de formaldeído em sua formulação.

Para a avaliação dos produtos foram realizados os ensaios de determinação de pH por potenciometria, a identificação do ácido glioxílico e formaldeído por reação qualitativa utilizando ácido cromotrópico e ácido sulfúrico e a quantificação do formaldeído pela reação com o sulfito de sódio quando não declarado no rótulo do produto e/ou em sua formulação a presença do ácido glioxílico, cuja documentação de notificação do produto foi solicitada junto a ANVISA.

No presente estudo, foram avaliadas 57 amostras de produtos cosméticos de diferentes marcas e denominações: “anti frizz”, selante, máscara, relaxante, tratamento capilar dentre outras denominações. Do total avaliado 59,65% estavam insatisfatórias por apresentar teor de formaldeído acima do permitido pela legislação vigente (0,2 %p/p) e não possuir notificação na ANVISA. Os valores de formaldeído encontrados nas amostras quando foi possível quantificar (sem a presença do ácido glioxílico na formulação) estão demonstrados na figura 1. O teor de pH em 52 amostras apresentou valores normais para este tipo de produto entre 5,5 e 7,0; exceto para 05 amostras cuja formulação continha o ácido glioxílico sem a presença de formaldeído, estas amostras o teor de pH encontrado estava abaixo de 2,0; sendo que duas amostras apresentaram pH igual a 0,9 e os produtos

estavam notificados na ANVISA como risco I. O estudo concluiu que existe uma necessidade de regulamentar o uso do ácido glioxílico, pois quando comparamos estes produtos quanto ao valor de pH com a legislação de saneantes⁶ e a classificação na OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development estas determinam que: produtos que apresentam pH abaixo ou igual a 2,5 e acima ou igual a 11,5 são considerados corrosivos e necessitam de registro e avaliação para restrição de uso; não sendo observado, esta a conduta nos produtos cosméticos avaliados. Alertamos também para o uso indiscriminado do formaldeído principalmente por parte do profissional do salão de cabeleireiro que manipula estes produtos diariamente, o que poderá acarretar danos à saúde do mesmo.

REFERÊNCIAS

1. Coelho GLV. Análise da decomposição do ácido glioxílico. Instituto de Tecnologia LPS/DEQ/UFRRJ, 2011.
2. Back RA & Yamamoto S. The gas-phase photochemistry and thermal decomposition of Glyoxilic acid. Can. J.Chem.1985; 63:542-48.
3. Brasil. Resolução RDC nº. 15 de 26 de março de 2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico “Listas de substâncias de uso cosmético: acetato de chumbo, pirogalol, formaldeído e paraformaldeído”. Diário [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 de Mar. 2013. Seção 1, p.55.
4. Pinheiro A. Ácido glioxílico: esclarecimento sobre nota da ANVISA. Rev. Cosmetic Toiletries. 2014; 26:36.
5. Brasil. Resolução RDC nº. 04/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 31 de Jan. 2014. Seção 1, p.67-70.
6. Brasil. Resolução RDC nº. 59/2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para notificação e o registro de produtos saneantes. Diário [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 de Dez. 2010. Seção 1, p.80-2.

Contribuição para a Epidemiologia da criptococose no Estado de São Paulo- dados do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no período de cinco anos

Jaqueline Otero SILVA¹; Paulo da SILVA¹; Marta Inês Cazentini MEDEIROS¹; Ana Maria Machado CARNEIRO¹ Maria Walderez SZEZS²; Marilena dos Anjos MARTINS²

¹Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto - Instituto Adolfo Lutz

²Instituto Adolfo Lutz Central

Criptococose é micose sistêmica causada por leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus* responsáveis, principalmente, por alterações do trato respiratório e sistema nervoso central. As espécies de importância clínica são *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* é cosmopolita, ocorre em diversos substratos orgânicos, frequentemente associa-se a habitat de aves, excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio. *C. gattii* é encontrada, preferencialmente, em regiões de clima tropical e subtropical. Anteriormente, seu habitat natural estava relacionado ao *Eucalyptus* spp atualmente, observa-se diferentes padrões geográficos de ocorrência fungo-árvore-madeira em decomposição¹. O trabalho tem como objetivo contribuir com os estudos epidemiológicos da criptococose no Estado de São Paulo, Brasil, especificamente nas regiões compreendida á Rede Regional de Assistência á Saúde - RRAS 13. Foram analisados 23 casos de criptococose com diagnóstico laboratorial confirmado no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2014. Leveduras encapsuladas foram isoladas da cultura do liquido cerebrospinal. A identificação da espécie seguiu os métodos tradicionais de assimilação de carbono e nitrogênio, hidrólise da

uréia, produção de fenoxidase em agar Niger e crescimento em meio de canavanina - glicina- azul de bromotimol (CGB). O teste de sensibilidade para o fluconazol (FZ) foi realizado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo seguindo os critérios estabelecidos pelo EUCAST. Os pacientes eram originários das cidades de Barretos (18), Ribeirão Preto (05) e Araraquara (1). A idade variou de 09 a 67anos e 17 (73,9%) foram do sexo masculino. *C. neoformans* ocorreu em 18 (78,3%) pacientes, *C. gatti* 01 (4,4%) e em 04 somente foram identificados quanto ao gênero. O total de 11 (84,6%) isolados de *C. neoformans* foram suscetíveis ao FZ com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,25 a 2,0 ug/mL, 1 (7,7%) foi sensível dependente da dose (SDD) com CIM de 4,0 ug/mL e 1 (7,7%) resistente com CIM de 8 ug/mL. A única amostra de *C. gatti* foi resistente ao FZ apresentando CIM de 8 ug/mL (Tabela 1.). A determinação da espécie e a detecção de cepas resistentes ao FZ, antifúngico amplamente utilizado na terapia dessa micose, principalmente na fase de manutenção do tratamento são dados importantes visto que, criptococose apresenta padrões diferentes dependendo da espécie e do hospedeiro. A resistência ao FZ do único *C. gatti* isolado corrobora com os achados na literatura de que essa espécie pode ser mais refratária ao tratamento^{2,3}.

Nº Paciente	Sexo	Idade	Município	Identificação	CIM para Fluconazol
1	M	43	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>NR</u>
2	M	31	Bebedouro	<i>C. neoformans</i>	<u>NR</u>
3	M	55	Bebedouro	<i>C. neoformans</i>	<u>NR</u>
4	M	30	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>NR</u>
5	M	41	Monte Alto	<i>Cryptococcus</i> sp	<u>NR</u>
6	M	36	Barretos	<i>Cryptococcus</i> sp	<u>NR</u>
7	M	38	Batatais	<i>Cryptococcus</i> sp	<u>NR</u>
8	F	9	Sertãozinho	<i>Cryptococcus</i> sp	<u>NR</u>
9	M	29	Bebedouro	<i>C. neoformans</i>	NR
10	M	45	Barretos	<i>C. neoformans</i>	0,25 ug/mL
11	M	45	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>0,5 ug/mL</u>
12	F	39	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>0,5 ug/mL</u>
13	M	42	Jaboticabal	<i>C. neoformans</i>	<u>1,0 ug/mL</u>
14	M	50	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>0,25 ug/mL</u>
15	F	NI	Barretos	<i>C. neoformans</i>	0,5 ug/mL
16	F	47	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>0,5 ug/mL</u>
17	M	26	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>1,0 ug/mL</u>
18	F	48	Bebedouro	<i>C. neoformans</i>	<u>0,5 ug/mL</u>
19	19	44	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>1,0 ug/mL</u>
20	20	51	Araraquara	<i>C. neoformans</i>	2,0 ug/mL
21	21	38	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>4,0 ug/mL</u>
22	22	67	Barretos	<i>C. neoformans</i>	<u>8,0 ug/mL</u>
23	23	59	Ribeirão Preto	<i>C. gattii</i>	<u>8,0 ug/mL</u>

NI= Não informado, NR= Não realizado

REFERÊNCIAS

1. Concenso em criptococose. Os desafios da criptococose em nosso país. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 68, p.524-44.
2. Subramanian S, Mathai D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. Journal Postgraduate Medicine. 2005; 51 Suppl 1: S21-6.
3. 1999 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clinical Infectious Diseases. 2000; 30 Suppl 1:S29-65.

Cryptococcus neoformans: importância no diagnóstico clínico das formas polimórficas

Lidiane de OLIVEIRA¹, Marcia de Souza Carvalho MELHEM²

1Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Coordenadoria de Controle de Doenças-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

2 Núcleo e micologia – Centro de Parasitologia e Micologia-Instituto Adolfo Lutz

A criptococose, micose sistêmica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, é uma das principais doenças invasivas em humanos. Estima-se que cerca de 957.000 casos de meningite por *Cryptococcus* spp. ocorram todo ano no mundo em indivíduos portadores do vírus HIV, resultando em mais de 600.000 mortes¹. Embora a meningoencefalite seja a forma letal, a infecção pulmonar é a mais freqüente, desde que, a via de aquisição da criptococose é por inalação de células fungicas. A criptococose também pode apresentar-se de forma disseminada, afetando órgãos como pele, rins, fígado e baço. Duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, são atualmente reconhecidas como os agentes mais comuns².

A criptococose é considerada uma das doenças definidoras de AIDS pelo Ministério da Saúde e um problema de saúde pública em nosso país. Devido ao fato de não ser uma doença de notificação compulsória, é difícil definir o número de casos e de óbitos relacionados a essa grave micose, contudo, as taxas de mortalidade por criptococose em pacientes com AIDS variam entre 45% e 65%³. Outras condições imunossupressoras, além da AIDS, estão relacionadas à criptococose por *C. neoformans* como o uso extensivo de corticoides

e transplantes de órgãos. A infecção por *C. gattii*, por sua vez, ocorre geralmente em indivíduos sem imunossupressão aparente².

As principais características utilizadas na identificação de *Cryptococcus* spp. são: observação ao exame direto de células leveduriformes, com ou sem brotamento, envoltas por cápsula mucopolissacarídica, realizado por coloração com tinta da China, tanto do material biológico quando do isolado. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que *Cryptococcus* spp. pode apresentar alterações em seu aspecto fenotípico habitual que podem dificultar no correto diagnóstico etiológico. Sabe-se que tais alterações, ou polimorfismo, podem funcionar como mecanismo que tornam esta levedura capaz de resistir às pressões do ambiente e ajudar a sua manutenção dentro do hospedeiro. Dentre essas alterações estão a formação de pseudohifas e aumento ou diminuição do tamanho celular observadas na amostra biológica, como: líquido, tecidos, urina e outros líquidos ou secreções corporais⁴.

A formação de pseudohifas em células de *C. neoformans* parece estar relacionada à baixa virulência desses isolados como visto em inoculação em camundongos. Foi observado que animais inoculados com isolados produtores apenas de blastoconídios adoeceram e morreram logo após 26 h de incubação,

enquanto os que foram inoculados com formas de pseudohifas permaneceram saudáveis durante o mesmo período. Ao analisarem a interação de *C. neoformans* e de amebas *Acanthamoeba polyphaga*, um dos seus predadores naturais, Neilson e colaboradores observaram que, além da formação de pseudohifas, essas estruturas não eram fagocitadas⁵.

A formação de células menores ou maiores do que as usuais, denominadas de formas anãs ou microformas (< 1µm de diâmetro) e células gigantes ou titãs (>10 a 100µm de diâmetro) é outro aspecto do polimorfismo em *Cryptococcus neoformans*. Embora as células titãs produzam também células-filhas de tamanho normal, supõe-se que o desenvolvimento de tais células esteja relacionado ao ciclo celular, desde que, por algum motivo não ocorre fissão, fazendo com que essas sejam tetraploides e octoploides, contendo maior quantidade de DNA⁶. Feldmesser e colaboradores verificaram que uma proporção significativa de células fúngicas em pulmão de camundongos aumentou de tamanho (900 vezes) em relação ao seu cultivo in vitro⁷. Resultados semelhantes foram observados por Bouklas e colaboradores durante infecção experimental, o que leva a acreditar que a presença de células com tamanho maior do que as formas típicas pode estar relacionada à cronicidade da doença⁸.

As células anãs são, em geral, encontradas dentro de macrófagos, mas a interferência dessa ocorrência para evolução da infecção é desconhecida. As células titãs são mais resistentes à fagocitose, além de possuírem a capacidade de tolerância a danos oxidativos e nitrosativos do hospedeiro. A maior resistência associada à capacidade de escape do sistema imunológico é benéfica para a sobrevivência de *Cryptococcus* spp. em pulmões no processo inicial da infecção; porém, provavelmente, podem impedir a sua disseminação para o sítio principal da doença, o sistema nervoso central⁶.

Até o momento, pouco se sabe sobre frequência e natureza do polimorfismo celular em isolados de

C. neoformans, seja pelo aumento de tamanho celular ou pela pseudofilamentação, mas alguns estudos demonstram que estas formações atípicas podem estar relacionadas à virulência e à cronicidade da infecção o que pode ter impacto na clínica médica⁸.

Arelevância clínica da ocorrência de polimorfismo celular é intrigante e há muito que se desvendar sobre a patogênese da criptococose causada por isolados contendo formas anômalas. Isto ressalta a importância de estudos sobre a biologia celular deste agente a fim de se valorizar estes achados durante a infecção.

Da mesma forma não se conhece o comportamento dos isolados polimórficos frente a fármacos utilizados no tratamento da criptococose e seu estudo poderia contribuir para desenvolvimento de ferramentas para auxiliar, ou prever, evolução clínica e direcionar melhor a terapia.

REFERÊNCIAS

1. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009; 23:525–530.
2. Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006;60:69-105.
3. Papalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2003; 45: 299-305.
4. Bava J, Solari R, Isla G, Troncoso A. atypical forms of *Cryptococcus neoformans* in CSF of an AIDS patient. *J Infect Developing Countries* 2008; 2(5):403-405.
5. Neilson JB, Ivey MH, Bulmer GS *Cryptococcus neoformans*: Pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infection And Immunity.*1978;Vol.20,1: 262-266.
6. Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16: 409–413.
7. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection *Microbiology.* 2001; 147:2355–2365.
8. Bouklas T, Pechuan X, Goldman DL, Edelman B, Bergman A, Fries BC. Old *Cryptococcus neoformans* cells contribute to virulence in chronic cryptococcosis. 2013 ; *MBio*, 4 :4, e00455-13.

Avaliação da ação desinfetante do ferrato(vi) em água para o consumo humano

Aparecida de Fátima MICHELIN^{1,2}; Maurício C. FREITAS²; Luciana Aparecida SCARPIN²; Fauze de Toledo RIBAS³; Arineia Francisco do NASCIMENTO¹; Teresa Marilene BRONHARO¹

¹*Centro de Laboratório Regional de Araçatuba-Instituto Adolfo Lutz*

²*Universidade Paulista – campus Araçatuba-SP*

³*Universidade do Estado de São Paulo-campus Araçatuba/SP*

O íon ferrato(VI) apresenta fórmula molecular FeO_4^{2-} e é um composto com grande potencial de oxidação-redução. Foi identificado por Stahl em 1702 quando este, fundindo salitre e limalhas de ferro e dissolvendo a mistura em água, obteve a formação de um produto de coloração púrpura instável¹. Tal molécula, em condições controladas, apresenta a conveniência de não fornecer subprodutos tóxicos quando empregada nos processos de desinfecção². Assim, o seu uso tem mostrado resultados satisfatórios no que diz respeito à preservação da saúde humana e à sustentabilidade do meio hídrico³.

Desta forma, o íon ferrato(VI) tem sido utilizado para o tratamento e controle de odores em meio líquido e gasoso, para a precipitação de substâncias, como o ferro e o manganês em substituição à cloração, e na desinfecção de grandes volumes hídricos⁴. Ainda, possui aplicações na degradação de poluentes sintéticos, na oxidação de poluentes inorgânicos, na remoção das substâncias húmicas e no tratamento de lodo de esgoto⁵.

A ação desinfetante do íon ferrato ocorre pela oxidação da molécula da água, gerando

radicais peróxidos, elétrons hidratados e oxidrilas, espécies altamente oxidantes³. Além de não fornecer subprodutos nocivos, o ferrato(VI) ainda se reduz para ferro (III), um coagulante por excelência².

Embora a atuação do íon esteja relacionada à suscetibilidade específica do micro-organismo, os efeitos bactericidas do desinfetante ferrato(VI) são, em sua maioria, atribuídos a mecanismos oxidativos de degradação direta das células ou de destruição de enzimas específicas que interferem na atividade celular⁶.

Em geral, após a descoberta do uso da cloração e seus potenciais efeitos negativos na saúde, a busca por desinfetantes alternativos tem sido avaliada para a sua substituição⁵. Atualmente, outros desinfetantes como o ozônio, o peróxido de hidrogênio, a radiação ultravioleta, o permanganato de potássio, o hipoclorito de cálcio em pastilhas e também o íon ferrato(VI) têm sido utilizados para tratamento de águas e efluentes⁶.

No Brasil, o controle microbiológico da água para o consumo humano se fundamenta principalmente na presença de bactérias do grupo coliforme⁶. Este grupo representa parâmetro microbiológico básico, uma vez que partilha a

capacidade de se desenvolver no intestino humano e causar doenças de cunho significativo para o mesmo. Os coliformes podem ser divididos em subgrupos conforme as suas características: coliformes totais, que inclui os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*; e os coliformes fecais ou termotolerantes que tem por principal componente a *Escherichia coli* e alguns coliformes do gênero *Klebsiella*⁷. Sendo então relevante a possibilidade da transmissão destes micro-organismos através da água, é importante identificar a condição sanitária da mesma. Uma vez confirmada a presença de micro-organismos patogênicos, as medidas para a desinfecção seletiva deverão ser aplicadas para sanar o problema.

Nesse cenário, mediante a vigente proposta de sustentabilidade do meio ambiente e visando a preservação e renovação da integridade hídrica, o íon ferrato, empregado em condições adequadas de pH, temperatura e tempo de contato, torna-se uma alternativa frente à desinfecção com cloro e seus derivados, uma vez que as dosagens empregadas, além de não formarem subprodutos como os trihalometanos (THMs) e os ácidos haloacéticos (HAAs), têm mostrado serem eficientes para inativar/destruir as bactérias do grupo coliformes sem haver recrescimento dias após o tratamento³.

A avaliação das concentrações efetivas de ferrato(VI) para a desinfecção da água para consumo humano torna-se relevante para a consolidação deste íon como alternativo ou substituto dos produtos presentemente empregados.

O objetivo deste estudo é avaliar a concentrações de íon ferrato(VI) capaz de eliminar *Escherichia coli* em água.

Foi preparada uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), em água destilada estéril, na concentração de $1,7 \times 10^6$ células/100mL (NMP), que foi distribuída em 10 frascos de polietileno estéril, em volume de 100 mL para cada um deles. Desses, dois não receberam tratamento e serviram de controle

para o desenvolvimento bacteriano. Os demais, em duplicata, receberam concentrações de 0,8 µL; 1,5 µL; 2,3 µL e 23 µL de solução de ferrato(VI) (Footoxi® – Foothills Industria e Comercio Ltda.). Tais frascos foram protegidos da ação da luz e mantidos em temperatura ambiente por período de 24 horas e 168 horas. Após 24 horas, numa série de cinco frascos, um para cada concentração de ferrato(VI) e um sem tratamento, foi realizada pesquisa quantitativa para *E. coli*. Após 168 horas, o mesmo procedimento foi realizado com a outra série de cinco frascos.

O pH das amostras em tratamento foi monitorado devido ao fato deste íon demonstrar maior integridade em potenciais alcalinos e neutros⁸.

A pesquisa de *E. coli* foi realizada através do Sistema Quanti-Tray Colilert® que emprega um substrato cromogênico⁹. Os resultados foram expressos de acordo com a tabela de NMP (número mais provável em 100 mL de água).

Foi verificado o desenvolvimento bacteriano nos frascos contendo suspensão de coliformes (17×10^6 NMP) tratados com 0,8 µL; 1,5 µL e 2,3 µL de Ferrato(VI) no tempo reacional de 24 horas. O tratamento de igual suspensão bacteriana com a maior concentração de ferrato(VI) (23 µL), em mesmo tempo reacional, apresentou menor contagem de célula bacteriana, após cultivo, se comparado com os frascos onde foram empregadas menores concentrações do desinfetante (Tabela 1).

No tempo reacional de 168 horas, para a mesma concentração de *E. coli*, foi verificado desenvolvimento bacteriano apenas no frasco tratado com a menor concentração de Ferrato(VI) (0,8 µL) (Tabela 1).

Na concentração de 23 µL (maior dose), o ferrato(VI) inativou 94% da suspensão bacteriana em apenas 24 horas (menor tempo). Já na concentração de 1,5 µL de ferrato(VI), a inativação foi satisfatória apenas no tempo reacional de 168 horas, fato não observado no tratamento desta mesma concentração

no tempo reacional de 24 horas (Tabela 1).

Os resultados neste estudo e os resultados expressos por Schuck et al. (2004) em estações de tratamento de esgotos, demonstraram comportamento desinfetante compatível, com decréscimo de micro-organismos proporcional à contaminação do efluente tratado.

Verificou-se que a concentração de *E. coli* na água utilizadas neste estudo foi muito maior do que a concentração média encontrada nas amostras tratadas por Schuck (2004), e que, portanto, o íon demonstrou ser efetivo em ambos os casos, dependendo das condições de tratamento.

Portanto, o ferrato(VI) é um desinfetante eficaz contra *E. coli*, sendo que o seu desempenho no tratamento de água é proporcional à sua concentração e ao tempo de contato.

REFERÊNCIAS

1. Delaude, L.; Laszlo, P.; Lehance, P. Oxidation of organic substrates with potassium ferrate (VI) in the presence of K10 montmorillonite. *Tetrahedron Letters*, 1995; v.36, p.8505-8508.
2. De Luca, S.J.; Chao, A.C.; Smallwood, C. Ames test of ferrate treated water. *Journal of Environmental Engineering*, 1983; v.109, 1159-1167.
3. Schuck, C.A. Ocorrência de trihalometanos e ácidos haloacéticos na desinfecção de efluentes tratados biologicamente. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRS, 2004. 98p.
4. Cantelli, M. Síntese e aplicação do ferrato (VI) de potássio no tratamento de efluentes industriais. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1988. 81f.
5. Jiang, J.Q. Research progress in the use of ferrate (VI) for the environmental remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 2007; v.146, p.617-623.
6. Daniel, L.A. (coord.). Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. Projeto PROSAB/FINEP, ABES, Rio de Janeiro, 2001, 139p.
7. Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
8. De Luca, M.A.; De Luca, S.J., Santana, M.A. Síntese eletroquímica do íon ferrato(VI). *Química Nova*, 2003; v.26 (3), p. 420-424.
9. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater by American Public Health Association, AWWA (American Water Works Association), Water Environment and E. W. Rice (Jan 5,2012).

Aplicação do ensaio de migração total na avaliação das embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos destinados a entrar em contato com alimentos

Paulo Eduardo Masselli BERNARDO; Lúcia Tieco Fukushima MURATA; Maria Rosa da Silva de ALCÂNTARA; César Braghini NETO; Sandra Aparecida NAVAS
Núcleo de Águas e Embalagens - Centro de Contaminantes – Instituto Adolfo Lutz

As embalagens e equipamentos poliméricos destinados a entrar em contato com alimentos, nas condições previsíveis de uso, não devem ceder aos mesmos, substâncias indesejáveis, tóxicas ou contaminantes, que representem um risco à saúde humana ^{1,2}.

A maioria dos testes efetuados em embalagens para alimentos é denominada provas de cessão ou testes de migração, que são determinações cuja finalidade é avaliar a quantidade de substâncias passíveis de migrar da embalagem para o alimento. A importância de tais determinações prende-se ao fato de que esses migrantes, além de potencialmente tóxicos ao homem, podem alterar as características do alimento ³.

Os ensaios de migração simulam as condições que a embalagem e o alimento serão submetidos em função do tipo de alimento, tempo e temperatura de contato. O ideal seria que estes ensaios fossem feitos colocando-se a embalagem em contato com o alimento que se pretende embalar. Entretanto, isto se torna impraticável, uma vez que a concentração de migrantes é normalmente baixa e a complexidade química da maioria dos alimentos

iria interferir em sua dosagem. Devido a esta impossibilidade, a legislação nacional assim como as legislações de vários países, estabelece o uso de solventes simulantes que tentam reproduzir o pH, o teor de gordura e eventual graduação alcoólica dos alimentos ^{2,3}.

O Núcleo de Águas e Embalagens, pertencente ao Centro de Contaminantes do Instituto Adolfo Lutz, controla a qualidade das embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos, destinados a entrar em contato com alimentos, através de análises que, visam determinar a compatibilidade da embalagem com o alimento, a sua não interferência com os caracteres sensoriais do produto e a migração total de componentes da embalagem para o alimento. O objetivo desse trabalho foi aplicar o ensaio de migração total na avaliação das embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos destinados a entrar em contato com alimentos, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2014.

A metodologia analítica para o controle de embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos encontra-se descrita na legislação nacional vigente - Resolução RDC Nº 51/10 da

ANVISA/MS⁴. Para o ensaio de migração, simulou-se as condições em que o material polimérico e o alimento serão submetidos. Para alimentos aquosos não ácidos utilizou-se como solvente simulante água deionizada (18,2MΩ-cm a 25°C); para alimentos aquosos ácidos, solução de ácido acético a 3% (m/v); para alimentos gordurosos, solução de etanol a 95% (v/v) e para alimentos alcoólicos, solução de etanol a 10% (v/v) ^{3,4}.

Do total de 464 amostras analisadas, 382 (82,33%) foram consideradas satisfatórias e 82 (17,67%) estavam em desacordo com os limites estabelecidos pela legislação em vigor ⁴ (Resolução RDC 51/10), de 8,0 mg/dm² ou 50,0 mg/kg, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Número de amostras de embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos analisadas no período de janeiro de 2011 a novembro de 2014.

Ano	Número de Amostras		Total de Amostras
	Satisfatória	Insatisfatória	
2011	126	26	152
2012	117	32	149
2013	87	15	102
2014	52	9	61
Total	382	82	464

Os dados obtidos neste trabalho evidenciam a importância do ensaio de migração total na avaliação das embalagens, equipamentos e revestimentos poliméricos destinados a entrar em contato com alimentos e a necessidade de contínuo monitoramento no controle da qualidade desses produtos, de forma a garantir o consumo de alimentos mais seguros por parte da população.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001. Aprova Regulamento Técnico: critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 jun. 2001. Seção I, p.60-61.
2. Murata LTF, Nunes MCD, Alcântara MRS, Pascuet NS, Bernardo PEM. Embalagens destinadas a alimentos. In: Germano, PML & Germano, MIS - Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 4a ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2011; 709-59.
3. Murata LTF, Nunes MCD, Alcântara MRS, Pascuet NS. Embalagens e equipamentos em contato com alimentos. In: Zenebon O, Pascuet NS. Métodos Físicos Químicos para Análise de Alimentos. 4aEd. Brasília: Editora MS. 2005; 533-66.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010. Aprova Regulamento Técnico que estabelece os critérios de migração para materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 nov. 2010. Seção I, p.105-109.

O íon ferrato(VI) apresenta fórmula molecular FeO_4^{2-} e é um composto com grande potencial de oxidação-redução. Foi identificado por Stahl em 1702 quando este, fundindo salitre e limalhas de ferro e dissolvendo a mistura em água, obteve a formação de um produto de coloração púrpura instável¹. Tal molécula, em condições controladas, apresenta a conveniência de não fornecer subprodutos tóxicos quando empregada nos processos de desinfecção². Assim, o seu uso tem mostrado resultados satisfatórios no que diz respeito à preservação da saúde humana e à sustentabilidade do meio hídrico³.

Desta forma, o íon ferrato(VI) tem sido utilizado para o tratamento e controle de odores em meio líquido e gasoso, para a precipitação de substâncias, como o ferro e o manganês em substituição à cloração, e na desinfecção de grandes volumes hídricos⁴. Ainda, possui aplicações na degradação de poluentes sintéticos, na oxidação de poluentes inorgânicos, na remoção das substâncias húmicas e no tratamento de lodo de esgoto⁵.

A ação desinfetante do íon ferrato ocorre pela oxidação da molécula da água, gerando radicais peróxidos, elétrons hidratados e oxidrilas, espécies altamente oxidantes³. Além de não fornecer subprodutos nocivos, o ferrato(VI) ainda se reduz para ferro (III), um coagulante por excelência².

Embora a atuação do íon esteja relacionada à suscetibilidade específica do micro-organismo, os efeitos bactericidas do desinfetante ferrato(VI) são, em sua maioria, atribuídos a mecanismos oxidativos de degradação direta das células ou de destruição de enzimas específicas que interferem na atividade celular⁶.

Em geral, após a descoberta do uso da cloração e seus potenciais efeitos negativos na saúde, a busca por desinfetantes alternativos tem sido avaliada para a sua substituição⁵. Atualmente, outros desinfetantes como o ozônio, o peróxido de hidrogênio, a radiação ultravioleta, o permanganato de potássio, o hipoclorito de cálcio em pastilhas e também o íon ferrato(VI) têm sido utilizados para tratamento de águas e efluentes⁶.

No Brasil, o controle microbiológico da

Leite Pasteurizado e ultra-alta temperatura (UAT): Avaliação do índice crioscópico e valor de pH

Maria Auxiliadora de Brito RODAS¹; Jacira Hiroko SARUWTARI-SATO¹; Anita Akiko TAKAHASHI^{*}; Davi Perini TEMERLOGLOU^{*}; Luciana SEPAROVIC^{*}; Giuliana Stael NARDINI^{*}

^{}Bolsistas FUNDAÇÃO(Fundação do Desenvolvimento Administrativo)*

¹Núcleo de Química, Física e Sensorial-Centro de Alimentos - Instituto Adolfo Lutz

O leite é obtido da ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene, de vacas leiteiras sãs, bem alimentadas e em repouso. É submetido a tratamentos térmicos com o propósito de proteger à saúde humana das doenças veiculadas por microrganismos patogênicos, além dos deteriorantes e enzimas que ocasionam alterações químicas que afetam a sua qualidade¹.

Os tratamentos térmicos podem ser por pasteurização lenta (LTLT “*Low Temperature Long Time*”, 63°C/30min.); rápida (HTST “*High Temperature and Short Time*”, 75-120°C/15 seg.) ou muito rápida (UHT “*Ultra Hight Temperature*”, 135°C/4 seg.), desempenhando o último maior valor comercial por prolongar a validade do leite na temperatura ambiente².

Pela legislação brasileira³ o leite pasteurizado é submetido a 72-75°C/15-20 segundos em pasteurizador de placas, seguido de resfriamento imediato até no máximo 4°C, com envase em circuito fechado para evitar a contaminação. O leite

UHT⁴ deve passar por processo de fluxo contínuo a 130-150°C/2-4 segundos e imediatamente resfriado à temperatura inferior a 32°C, sendo envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

O controle de qualidade visa avaliar integridade e condições sanitárias. O leite fluído deve apresentar aspecto de líquido opaco, sem grumos, coágulos, flóculos ou mucosidade e a camada de gordura não deve ser filante; deve ter cor branca ou levemente amarelada e odor e sabor característicos⁵. As análises físico-químicas envolvem a gordura, acidez, densidade, índice crioscópico (IC), sólidos não-gordurosos e alizarol, devendo estar ausentes de neutralizantes de acidez e reconstituintes de densidade⁵. No leite UHT, ainda se avalia a estabilidade ao etanol (68%)⁴, pois é aceito como indicador de acidez, mistura do leite com colostro ou leite proveniente de animais com mastite¹.

A estabilidade térmica do leite varia em função do pH. A velocidade de alteração depende do pH inicial e disponibilidade de oxigênio necessário

à formação de ácido a partir da lactose. A velocidade da produção do ácido é fator importante para coagulação pelo calor, pois o pH de coagulação é baixo¹. A legislação não prevê determinar pH, mas é fundamental pois visa detectar aumentos na concentração de ácido láctico e estabilidade ao calor, podendo indicar qualidade microbiológica inadequada. O pH do leite fresco varia de 6,6-6,8 a 20°C. Se for proveniente de glândulas mamárias inflamadas, como mastite, fica com pH levemente alcalino (7,3 a 7,5)⁷.

Pela medida do IC pode-se detectar adição fraudulenta de água ao leite ou ineficiência no sistema de ordenha. O valor desta medida corresponde à temperatura na qual o leite congela, e isto ocorre a - 0,55° C, que por ser constante se considerada uma prova de precisão⁸. Qualquer alteração acarreta prejuízos à indústria, visto que há menor rendimento de produção, com perda da qualidade dos subprodutos, além de ser sério problema de saúde pública. A legislação não prevê determinar IC no leite UHT, apenas no leite fresco e pasteurizado.

O estudo objetivou avaliar os valores de pH e IC de leite pasteurizado e UHT. Foram avaliadas 1556 amostras de leite, sendo pasteurizado (1395) e UHT (161). Ao todo, envolveram 103 usinas brasileiras distintas, 72 ligadas à pasteurização e 47 ao processo UHT. As amostras encontravam-se em suas embalagens originais conservadas e na validade.

Na medida do pH ou atividade iônica (íon H⁺) utilizou Potenciômetro digital (DM 20, marca DIGIMED), onde o eletrodo padrão mede a diferença de potencial entre ele e leite, sendo ela expressa em unidades de pH à 25°C. Houve calibração do equipamento com soluções-tampão pH 4, 7 e, logo após, três leituras consecutivas da amostra.

O IC foi medido por leitura direta em Crioscópio digital aferido com soluções-tampão de cloreto de sódio 6,859 g/L (-0,408°C ou -0,422°H) e sacarose 100 g/L (-0,600°C ou -0,621°H), com

tolerâncias de 2 miligraus Hortvet (0,002°H). O resultado é expresso em graus Celsius (°C) e convertido em escala Hortvet (°H), com tolerância de $\pm 0,002$ °H, sendo a conversão feita pela relação: $T(^{\circ}H) = 1,0356 \times T(^{\circ}C)$. As leituras foram realizadas em triplicata.

Os resultados obtidos estão na Tabela 1, onde se verifica que em ambos os tratamentos térmicos os valores de pH e IC se situaram bem próximos. O pH médio do leite UHT (6,80) foi ligeiramente superior ao pasteurizado (6,60), mas conformes aos valores da literatura⁷. Para IC, o leite UHT apresentou média (-0,526°C) praticamente idêntica ao pasteurizado (-0,532° C), sendo a mediana -0,530° C. Neste ensaio, 100% das amostras de leite pasteurizado estavam de acordo com a legislação, porém para leite UHT, os valores obtidos podem servir de referência para inserção no regulamento. O mesmo ocorre para o pH de ambos os processos de conservação do leite.

As análises oficiais do leite são realizadas por Unidades Operacionais da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite, pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ou credenciada, que podem, a critério, utilizar os dados informativos constantes neste trabalho.

Pelo contexto, se propõe que leites tratados por processos pasteurizados e UHT sejam, doravante, avaliados quanto aos valores de pH e IC, como prova de integridade, autenticidade e sanidade do alimento destinado ao consumo humano. Isto faz com que a adulteração do leite pela aguagem, utilização de reconstituintes de densidade (substâncias e misturas pré-balanceadas estranhas ao leite) e problemas técnicos e higiênico-sanitários estritamente ligados ao processo tecnológico sejam minimizados, melhor controlados e ou extintos da cadeia produtiva, desde sua coleta até o consumo final, beneficiando a saúde da população.

Tabela 1. Valores de pH e índice crioscópico (IC) de leite pasteurizado e leite UHT

Parâmetros	Leite Pasteurizado			Leite UHT		
	pH	IC (°C)	IC (°H)	pH	IC (°C)	IC (°H)
Mediana	6,60	-0,530	-0,549	6,80	-0,530	-0,549
Média	6,62	-0,532	-0,547	6,80	-0,526	-0,551
Desvio padrão	0,14	0,041	0,048	0,20	0,054	0,042
Coefficiente de variação	0,218	-0,0766	-0,0874	0,0232	-0,1033	-0,0767
Nº Amostras	333	1395	1395	83	161	161

REFERÊNCIAS

1. SILVA PHF. *Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação*. 1ª Ed. Juiz de Fora (Brasil): 2004.
2. BUSANELLO, M; POZZA, MSS; PEDROS, F; et al. Avaliação da composição de pH e ponto de congelamento de leites padronizado, semidesnatado e desnatado no processo de ultrapasteurização. *Anais: XXI Cong. Bras. Zootec., Maceió, 2011*;23-27.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, Brasília: *Diário Oficial da União*, 20 set 2002, Seq. 1, p. 13.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA). Portaria nº 370, de 4 de setembro de 1997, Brasília: *Diário Oficial da União*, 8 set 1997, Seq. 1, p. 19700.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, Brasília: *Diário Oficial da União*, 30 dez 2011, Seq. 1, p. 6.
6. SANTOS, MV, FONSECA, LFL. *Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
7. GLAESER, H. Control of the water content of dairy products - definition of limits, consideration of process variation, official use autocontrol data. *Food Chemistry*, 2003;82:121-124.

