

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 62 número 2, 2003



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## **DIRETOR RESPONSÁVEL**

DR. CRISTIANO CORRÊA DE AZEVEDO MARQUES  
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

## **COMISSÃO DE REDAÇÃO**

JANETE ALABURDA - **PRESIDENTE**  
CECÍLIA CRISTINA MARQUES DOS SANTOS – **SECRETÁRIA**  
ÂNGELA CRISTINA GHILARDI  
CRISTINA ADELAIDE FIGUEIREDO  
CRISTINA TAKAMI KANAMURA  
LUZ MARINA TRUJILLO  
MARINA YOSHIÊ SAKAMOTO MAEDA  
RAQUEL DOS ANJOS FAZIOLI  
SABRIA AUED PIMENTEL  
THAÏS VALÉRIA MILANEZ - **MEMBRO CONVIDADO**  
CLAYDES DE QUADROS ZAMBONI - **MEMBRO EMÉRITO**  
MARIA LUISA BARBOSA - **MEMBRO CONVIDADO**

## **SETOR DE PUBLICAÇÕES**

ROCELY APARECIDA de SOUZA BUENO

---

## **ENDEREÇO/ ADDRESS**

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

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

Ano 2003

---

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

1941 – 2003,  
2003, 62 (2)

ISSN 0073-9855  
RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

(\* ) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.  
*Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas*, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX., Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS, SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outro

**Acesso on line/ on line access**

**Texto integral/ full text**

[www.ial.sp.gov.br](http://www.ial.sp.gov.br)

## AOS COLABORADORES

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

Os artigos destinados à REVISTA somente serão recebidos se redigidos de acordo com as seguintes normas:

### NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Serão aceitos manuscritos em forma de artigos científicos, de revisões, de atualizações, relatórios técnicos, relatos de casos, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores devem escrever na carta de encaminhamento qual a natureza do trabalho. Os originais serão publicados em língua portuguesa ou inglesa preferencialmente. Deverão ser encaminhados em três vias, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e em disquete 3 1/2 conforme instruções que serão enviadas após a aprovação.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**ABREVIATURAS** - Devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

**UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS** - Utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

**TABELAS** – As Tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas. A localização aproximada destas deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

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

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

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

Todas as ilustrações devem ser identificadas com número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade; as respectivas legendas devem estar escritas fora da área de reprodução. As ilustrações coloridas estão sujeitas à con-

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

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

**A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.**

**No texto** – As referências serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, escritas em versal. Assim, para um autor: “Taunay<sup>31</sup> verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra e: “Pereira e Maia<sup>19</sup>, pesquisando...”. para mais de dois autores usar a expressão et al : “no trabalho de Tsunoda et al <sup>6</sup>”; ou ainda...“ Segundo vários autores <sup>1,3,7,8</sup> ”.

**Observação: nomes científicos somente em itálico.**

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

Para artigos periódicos

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

Exemplo:

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

Livro no todo

Último sobrenome do (s) autor (s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra, edição, imprensa (local de publicação, editora e ano de publicação), descrição física (nº páginas ou volumes), notas especiais.

Exemplo:

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

**Capítulo de Livro**

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

Exemplo:

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

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

p.30-36.

Dissertações e Teses

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

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

Exemplo:

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

## DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na **Revista do Instituto Adolfo Lutz** deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações.

2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto desta comissão.

3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.

4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.

5. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no final do mesmo.

6. As provas tipográficas serão revisadas pela Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Essa Comissão se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

7. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

## DA DISTRIBUIÇÃO

A Revista Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo/Article

- 941 **Resíduos de endossulfan em solo (Latossolo Roxo) cultivado com soja [*Glycine max* (L.) Merrill]<sup>1</sup>**  
Residues of Endossulfan in soil (Latossolo Roxo) cultivated with soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]  
Célia M. D. CORRÊA, Jorge J. do V. OLIVEIRA e Valdemar L. TORNISIELO ..... 69 - 75
- 942 **Análise de matérias estranhas em amostras de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., provenientes de sistemas de cultivo nativo e adensado<sup>1</sup>**  
Extraneous material in maté, *Ilex paraguariensis* St. Hil., from native and compact cultivation systems<sup>1</sup>  
Larissa R. BORGES, Sonia M. N. LAZZARI e Flávio A. LAZZARI ..... 77 - 82
- 943 **Inquérito sorológico, após epidemia de Dengue. Paraíso – São Paulo**  
Serological survey after Dengue outbreak Paraíso city – São Paulo state  
Sirle A. S. SCANDAR, Rubens P. CARDOSO JUNIOR, Paulete GOLDENBERG, Ivani B. FERREIRA e  
Luiza T. M. DE SOUZA ..... 83 - 89
- 944 **Red cell glutathione reductase saturation obtained with oral riboflavin supplementation**  
Saturação da glutathione reductase eritrocitária obtida pela suplementação oral com riboflavina  
Marilena OSHIRO, Kimiyo NONOYAMA, Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA e  
Orlando César de O. BARRETTO ..... 91 - 94
- 945 **Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2**  
Procedure for simultaneous determination of trichothecenes: deoxynivalenol and T-2 toxin  
Edilira BARAJ e Eliana BADIALE-FURLONG. .... 95 - 104
- 946 **O uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs) nos acidentes ocorridos em um laboratório de saúde pública no período de maio de 1998 a maio de 2002**  
Individual and collective protection equipments (IPE and CPE) wearing in a health public laboratory accidents from may 1998 to may 2002  
Marise SIMÕES, Eneida Gonçalves LEMES-MARQUES, Paulo Flávio Teixeira. CHIARINI e  
Maria de Fátima Costa PIRES ..... 105 - 109
- 947 **Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil**  
Occurrence of *Salmonella* spp in chicken meat marketed in Bauru, SP, Brazil  
Daniel P. MATHEUS, Aristides C. RUDGE e Sônia M. M. GOMES ..... 111 - 115

948	<b>Níveis de Arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (<i>Leporinus obtusidens</i> e <i>Pimelodus maculatus</i>) do Lago Guaíba em Porto Alegre RS-Brasil</b> Total Arsenic levels as a bioindicator in the evaluation of fish quality ( <i>Leporinus obtusidens</i> and <i>Pimelodus maculatus</i> ) from the Guaiba Lake, Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil Roseli de O. MÖLLERKE, Isa B. NOLL, Maria Aparecida B. E. SANTO e Diego M. NORTE .....	117 - 121
949	<b>Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz</b> Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice Eliane M. R. S. SIMIONATO, Renato M. ASTRAY e Célia M. de SYLOS .....	123 - 130
950	<b>Ácidos graxos saturados versus ácidos graxos trans em biscoitos.</b> Saturated fatty acids versus trans fatty acids in cookies. Sabria AUED-PIMENTEL, Miriam S. F. CARUSO, José M. M. CRUZ, Edna E. KUMAGAI e Daniela U. O. CORRÊA .....	131 - 137

## RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

<b><i>In vitro</i> cytotoxicity test as an alternative to <i>in vivo</i> Draize test for the evaluation of cosmetic.</b> Cruz, A. S .....	139
<b>Pesquisa de sítios de restrição enzimática em segmento da <i>ORF KI</i> do genoma de herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em isolados clínicos de São Paulo: relação com subtipos virais e implantação da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses) para determinar subtipos virais.</b> Moreira, A. A. ....	140
<b>Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo.</b> Carbone, P. H. L. ....	141
<b>Evaluation of culture media in the primary isolation and presumptive identification of yeasts from different biological samples</b> Silva, J. O. ....	142
<b>Comparative study of urinary cytology in urine and bladder washing samples, and between simple smear, membrane filter and cytocentrifugation techniques.</b> Sakai, Y. I. ....	143
<b>Avaliação de uma unidade produtora de alface (<i>Lactuca sativa</i>) minimamente processada visando a implementação do sistema APPCC.</b> Cruz, A. G. da .....	144
<b>Antigenic expression of LPS from brazilian meningococcal strains, production of monoclonal antibodies as subsidy to epidemiological studies.</b> Belo, E. F. T .....	145
<b>Study of systemic immune response in mouse after inoculation by different immunization routes with.</b> Oliveira, A. P. da S. ....	146
<b>Use of monoclonal antibodies in the selection of lps from the epidemic strain B:4:P1.15 of <i>Neisseria meningitidis</i> B: nasal immunization.</b> Coutinho, L. M. C. C. ....	147
<b>Trichothecenes in corn: optimization and evaluation of gas chromatography associated to mass spectrometry method and survey in corn and corn-based products in Sao Paulo state.</b> Milanez, T.V. ....	148
<b>ERRATA</b> .....	149

## Resíduos de endosulfan em solo (Latossolo Roxo) cultivado com soja [*Glycine max* (L.) Merrill] <sup>1</sup>

Residues of endosulfan in soil (Latossolo Roxo) cultivated  
with soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]

Célia M. D. CORRÊA <sup>2</sup>  
Jorge J. do V. OLIVEIRA <sup>3\*</sup>  
Valdemar L. TORNISIELO <sup>4</sup>

RIALA6/941

Corrêa, C. M. D.; Oliveira, J. J. do V.; Tornisielo, V. L. - Resíduos de endosulfan em solo (Latossolo Roxo) cultivado com soja [*Glycine max* (L.) Merrill] <sup>1</sup>. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 69 - 75, 2003.

**RESUMO.** O emprego dos agrotóxicos na agricultura reduz a perda de alimentos ao combater as pragas, porém os seus resíduos podem contaminar o meio ambiente, principalmente o solo. Este trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de resíduos do inseticida endosulfan e seu principal metabólito, sulfato de endosulfan, em solo cultivado com a soja. O experimento com a soja foi conduzido em uma área de 900m<sup>2</sup>, dividida em três parcelas iguais, destinadas ao controle (sem aplicação do inseticida), ao sistema de manejo integrado de pragas (MIP) e ao sistema convencional, com aplicações de endosulfan nas doses de 437g i.a./ha e 1312g i.a./ha, respectivamente. O endosulfan foi quantificado por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (<sup>63</sup>Ni), sete dias e um ano após cada pulverização. Não foi detectado nenhum resíduo do inseticida endosulfan no solo (10-20cm), onde foi cultivada a soja no sistema MIP, dentro do limite de quantificação do método [ $\alpha$ -endosulfan (0,005mg/g),  $\beta$ -endosulfan (0,005mg/g) e sulfato de endosulfan (0,1mg/g)]. O resíduo de endosulfan total no solo foi de 0,06mg/g para o MIP na profundidade de 0-10cm e para o sistema convencional os níveis foram 0,14 $\mu$ g/g (0-10cm) e 0,03 $\mu$ g/g (10-20cm). Após um ano da aplicação de endosulfan, nenhum resíduo foi detectado em solo (0-20cm) nos dois sistemas. Ambos os sistemas de cultivo da soja foram eficazes no controle de pragas, todavia o MIP foi sugerido por resultar em menor nível de contaminação de endosulfan no solo.

**PALAVRAS-CHAVE.** solo, soja, sistemas convencional e MIP, endosulfan.

<sup>1</sup> Trabalho apresentado na 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 23 a 26 de maio de 2000, Poços de Caldas/MG.

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, M.Sc., Departamento de Ecotoxicologia – BIOAGRI Laboratórios Ltda. - Piracicaba/SP. (e-mail: cdcorrea@bioagri.com.br).

<sup>3</sup> Químico, Pesquisador Científico, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada. Campinas, SP (e-mail: jorgejvo@ital.org.br).

<sup>4</sup> Seção de Ecologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP. – Piracicaba/ SP. (e-mail: vitornis@cena.usp.br)



## INTRODUÇÃO

A soja é considerada um dos alimentos do futuro, porque é a melhor fonte de proteína de baixo custo e de alto valor nutricional que se conhece para a alimentação humana, além de ser uma cultura que apresenta alta produtividade e facilidade de adaptação em quase todas as regiões do mundo<sup>4</sup>.

O Brasil é responsável por cerca de 20% da produção mundial de soja e é o segundo maior produtor de oleaginosas. Atualmente, verifica-se uma forte expansão na área cultivada com soja com investimentos em tecnologia pelo sojicultor, visando o aumento da produtividade. Este investimento tem contribuído sensivelmente para o aumento da demanda de insumos. Estima-se que a produção de soja deverá crescer 39% até o ano 2005<sup>1</sup>.

Um dos obstáculos à produção de soja é a ocorrência de pragas que podem inviabilizar a produtividade, acarretando prejuízos econômicos para o sojicultor. Dentre as pragas que atacam a soja, as mais preocupantes são as lagartas, cuja infestação se dá principalmente na fase vegetativa, e os percevejos que atacam do início da fase de floração até o final do desenvolvimento das sementes. A administração de pesticidas é uma das providências eficazes no combate a estas pragas.

Entre os vários pesticidas, o endossulfan, de nomenclatura IUPAC 6,7,8,9,10,10 - hexacloro-1,5, 5a, 6, 9, 9a- hexahidro- 6, 9, metano-2,4,3-benzo dioxatiepín-3-óxido é um inseticida largamente empregado na cultura de soja, devido à sua ação eficaz no combate às pragas, não havendo produto substituto de igual eficiência<sup>7</sup>. Foi introduzido no mercado em 1957 com o nome comercial Thiodan e possui registro para a aplicação em soja por meio da Portaria nº 95/85 do Ministério da Agricultura, tendo como Limite Máximo de Resíduos (LMRs) de Pesticida de 1,0 mg/kg para esta cultura<sup>2, 8, 23</sup>. O ingrediente ativo consiste na mistura de dois estereoisômeros, sendo 70%  $\alpha$ -endossulfan e 30% de  $\beta$ -endossulfan<sup>12</sup>. O sulfato de endossulfan é o principal produto de degradação química, resultado da oxidação dos isômeros, segundo Goebel et al<sup>8</sup>.

Embora no estágio atual de desenvolvimento da ciência e da tecnologia os pesticidas sejam essenciais para viabilizar a produção de alimentos em grande escala, se não forem administrados segundo as boas práticas agrícolas, os mesmos podem contaminar os alimentos e o meio ambiente, principalmente o solo. Uma vez presentes no solo, os pesticidas são susceptíveis de lixiviar através deste e atingir o lençol freático<sup>5, 19, 20, 24</sup>.

O comportamento dos pesticidas no solo é de extrema complexidade por implicar em numerosas interações entre as fases sólida, líquida e gasosa. Entre outros, o processo de adsorção/dessorção dos pesticidas pelos colóides orgânicos e inorgânicos do solo é de natureza físico-química e controla a concentração do produto na solução do solo ou na planta, determinando a sua atividade biológica, mobilidade e

volatilidade. Associado a esta questão, a baixa solubilidade do endossulfan e dos seus metabólitos em água contribui para sua alta adsorção às partículas orgânicas no solo e para sua baixa mobilidade, podendo acarretar em uma persistência indesejável ao ambiente<sup>13</sup>.

Em função destes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de resíduos de  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan no solo cultivado com soja que recebeu aplicação deste inseticida através dos sistemas de manejo integrado de pragas (MIP) e convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Soja

A variedade da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizada foi a IAC 8-2 cultivada em campo experimental do Departamento de Genética na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo. O plantio da soja foi realizado em março de 1997 e a colheita efetuada em julho de 1997 e julho de 1998.

### Solo

O experimento foi implantado em solo latossolo roxo (LR), devidamente preparado com o uso de uma grade aradora. A área total de 900m<sup>2</sup>, isenta de qualquer aplicação anterior de endossulfan, foi dividida em três parcelas iguais de 300m<sup>2</sup>, sendo uma parcela controle e as outras duas reservadas para os tratamentos nos sistemas MIP e convencional. Cada parcela continha uma população de 40 plantas/m<sup>2</sup>, sendo 50cm entre linhas e 5cm entre plantas. Entre as parcelas foi deixada uma bordadura de 2,5m. Foram adotados para todas as parcelas os mesmos tratos culturais como preparo do solo e controle de plantas daninhas.

### Análise físico-química do solo

Foram utilizadas as metodologias apresentadas por Raij et al., 2001<sup>21</sup>, nas análises físico-químicas do solo.

### Controle de infestação de pragas nos sistemas MIP e convencional

O controle de pragas na cultura de soja no sistema MIP consistiu de uma pulverização com endossulfan (100 dias após a semeadura) e de inspeções semanais à lavoura, com auxílio do pano de batida, batendo-se duas linhas de soja em direção ao pano branco com 0,5m de largura e 1,0m de comprimento, colocado na entrelinha junto ao solo. A soja cultivada no sistema convencional recebeu somente três pulverizações com o inseticida endossulfan. As três pulverizações foram realizadas 60, 100 e 112 dias após a semeadura.

### Aplicação do inseticida endossulfan

Foi utilizado o produto comercial Thiodan 35 CE (1,25L/ha), aplicado com pulverizador de barras, marca Jacto PJ 500 com 19 bicos F 110/1.2/3 110°-SF-03, acoplado ao trator, nas doses recomendadas pela EMBRAPA<sup>6</sup> de 437g de i.a./ha e 1312g de i.a./ha, para os sistemas MIP e convencional, respectivamente. A soja testemunha não recebeu nenhum tratamento.

### Amostragem do solo

O solo foi coletado com trado nas três parcelas nas profundidades de 0-10cm e 10-20cm, antes de qualquer tratamento, 7 dias e um ano após a soja ter sido pulverizada com endossulfan. Foram coletadas em média 15 subamostras de cada profundidade e de cada parcela. Estas subamostras foram homogeneizadas para formar a amostra composta.

Após secagem à temperatura ambiente por um período de 3 dias, o solo foi destorrado, peneirado em malha de 2mm e acondicionado em frascos de vidro de 500mL, fechados e armazenados em freezer à temperatura de -18°C até a realização das análises.

### Padrões de $\alpha$ -endossulfan, $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan.

Os padrões de  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan, todos com índice de pureza de 99%, foram fornecidos pela Hoechst Schering Agrevo, Frankfurt. Prepararam-se soluções de 100 $\mu$ g/mL dos três padrões dissolvidos em hexano para resíduos. Após diluições com este solvente, obtiveram-se concentrações de 1,0 $\mu$ g/mL, 0,5 $\mu$ g/mL, 0,1 $\mu$ g/mL, 0,05 $\mu$ g/mL e 0,001 $\mu$ g/mL.

### Método de extração de endossulfan no solo

Utilizou-se o método de Luke et al.<sup>15</sup> para extração de  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan no solo, segundo as etapas descritas a seguir.

Pesaram-se 5g de solo em erlenmeyer, adicionaram-se 150ml de acetona para resíduo e agitou-se durante 60 minutos. O extrato foi filtrado, utilizando-se funil Büchner com papel de filtro Whatman n° 5 (previamente tratado com acetona) e recolhido em kitasato acoplado à bomba de vácuo. Transferiu-se o filtrado para balão volumétrico e completou-se o volume a 200mL com acetona para resíduo. Uma alíquota de 20mL foi transferida para um funil de separação de 500mL, acrescentaram-se 40mL de solução aquosa saturada com NaCl e adicionaram-se 100mL da mistura de hexano:diclorometano (50:50). O funil foi agitado durante 5 minutos e deixou-se em repouso até separação das fases orgânica e aquosa. Reservou-se a fase orgânica. Na fase aquosa adicionaram-se 40mL de diclorometano e, em seguida, a mistura foi agitada durante 1 minuto. Após separação, a fase aquosa foi descartada e esta fase orgânica foi misturada com a primeira fase orgânica reservada. A fase orgânica foi filtrada em funil com sulfato de sódio previamente desidratado e o filtrado foi evaporado até quase à secura em rotavapor à temperatura de 40°C e secado totalmente com nitrogênio. O extrato foi retomado em hexano para análise de resíduos,

transferido com pipeta de Pasteur para um tubo concentrador e evaporado com nitrogênio até o volume que apresentasse concentração dentro da faixa de linearidade do detector.

### Quantificação de endossulfan no solo

Para quantificação de endossulfan no solo foi utilizado o cromatógrafo gasoso Varian 3.700 com coluna 5% SE-30 (100-120 Supelcoport) com 1,5m de comprimento, 2mm de diâmetro interno e 6mm de diâmetro externo, equipado com detector de captura de elétrons (DCE). As condições cromatográficas foram previamente otimizadas nas seguintes condições: injetor a 240°C, detector a 320°C e coluna com temperatura programada de 150°C durante 5 minutos, gradiente de temperatura de 10°C/min até 240°C (5 minutos) e nitrogênio como gás de arraste na pressão de 35psi (6,8 atm). Atenuação de 8.10.

Nestas condições, as curvas de calibrações apresentaram linearidade entre 0,005 a 0,020ng para  $\alpha$ -endossulfan e  $\beta$ -endossulfan e entre 0,05 a 0,20ng para sulfato de endossulfan, com coeficientes de linearidade de 0,9974, 0,9951 e 0,9946, respectivamente. O endossulfan foi quantificado pelo método do padrão externo.

### Confirmação de endossulfan no solo

Para confirmação do  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan em solo foi utilizado o cromatógrafo gasoso Varian 3.400, equipado com DCE (<sup>63</sup>Ni) e coluna megabore DB-5 com comprimento de 30m, diâmetro interno de 0,53 $\mu$ m e fase estacionária com filme de 0,85 $\mu$ m. As condições cromatográficas foram de 300°C para o detector, 250°C para o injetor e coluna com temperatura programada de 180°C durante 1 minuto, gradiente de 6°C/min. até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. Gás de arraste nitrogênio com pressão de 18psi. Atenuação de 8.10.

### Validação da metodologia

Para validação da metodologia, 5g de amostras de solo testemunha foram fortificadas com 1ml de soluções de 0,5 $\mu$ g/mL, 0,05 $\mu$ g/mL e 0,025 $\mu$ g/mL de  $\alpha$ -endossulfan e  $\beta$ -endossulfan; e 1mL de 5,0 $\mu$ g/mL e 0,5 $\mu$ g/mL para sulfato de endossulfan. Após fortificação, o endossulfan foi extraído conforme descrito anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físico-químicas do solo encontram-se na Tabela 1. Devido aos resultados dessas análises físico-químicas do solo, não houve a necessidade de correção do pH e de adubação com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK).

**Tabela 1.** Resultados das análises físico-químicas\* do solo latossolo roxo.

Solo (cm)	pH	M.O. g.dm <sup>-3</sup>	P mg.dm <sup>-3</sup>	K mg.dm <sup>-3</sup>	Ca mg.dm <sup>-3</sup>	Mg Mmole.dm <sup>-3</sup>	H+Al mmole.dm <sup>-3</sup>	S.B. mmole.dm <sup>-3</sup>	V (%)
0-10	5,3	19	117	6,1	59	17	28	82,1	75
10-20	5,0	19	103	6,1	60	19	31	85,1	73

\* Raij et al., 2001<sup>21</sup>

Nas análises de resíduos foi utilizado o método de Luke et al.<sup>15</sup> dispensando-se a limpeza dos extratos por cromatografia de coluna, porque nos perfis cromatográficos das amostras de solo testemunha não foram detectados picos

interferentes nos tempos de retenção do  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan. Os resultados das recuperações após fortificação em amostras de solo testemunha encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fortificações e resultados das recuperações de resíduos de endossulfan em amostras de solo testemunha.

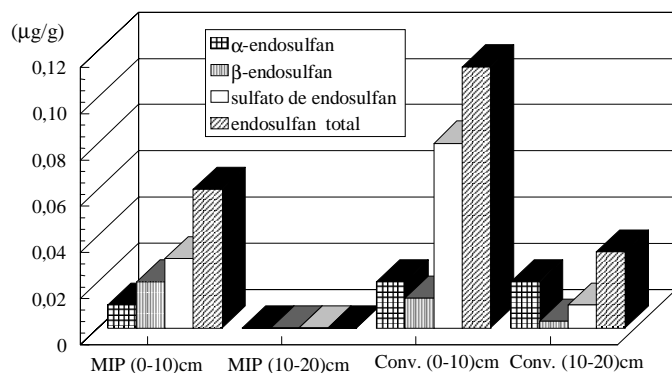
Inseticida	Massa da Amostra (g)	Nível de Fortificação ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação* (%)	Desvio padrão ( $\pm$ )	Coefficiente de Variação (%)
$\alpha$ -endossulfan	5	0,1	90,7	4,4	4,8
		0,01	72,9	2,7	3,7
		0,005	71,8	1,8	2,5
$\beta$ -endossulfan	5	0,1	92,1	2,8	3,0
		0,01	80,0	6,6	8,2
		0,005	81,2	2,1	2,5
Sulfato de endossulfan	5	0,1	88,7	4,9	5,5
		1,0	74,6	2,3	3,0

\* Média de cinco repetições.

Limite de quantificação do método:  $\alpha$ -endossulfan (0,005  $\mu\text{g/g}$ );  $\beta$ -endossulfan (0,005  $\mu\text{g/g}$ ) e sulfato de endossulfan (0,1  $\mu\text{g/g}$ ).

Os resultados das avaliações dos níveis residuais de endossulfan no solo provenientes de plantio de soja nos sistemas MIP e convencional estão ilustrados na Figura 1. Os níveis de endossulfan total correspondem à soma dos níveis dos dois isômeros e do produto de degradação. O resíduo de endossulfan total no solo, sete dias após aplicação deste inseticida, foi de 0,06  $\mu\text{g/g}$  para o MIP na profundidade de 0-10cm e para o sistema convencional os níveis foram 0,14  $\mu\text{g/g}$  (0-10cm) e 0,03  $\mu\text{g/g}$  (10-20cm).

Verifica-se pela Figura 1 que os níveis de endossulfan total, dos seus isômeros e do metabólito foram maiores no solo em que a soja foi cultivada no sistema convencional do que no sistema MIP.



**Figura 1.** Resultados das concentrações ( $\mu\text{g/g}$ ) de resíduos dos estereoisômeros  $\alpha$ -endossulfan e  $\beta$ -endossulfan e do metabólito sulfato de endossulfan nas profundidades de 0 a 10cm e de 10 a 20cm em solo cultivado com soja nos sistemas MIP e convencional (Conv.).

Não foram detectados resíduos de  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan na profundidade de 10-20cm em solo cultivado com soja no sistema MIP, dentro do limite de quantificação do método. Como o nível de endossulfan total na profundidade de 0-10cm foi baixo neste sistema de cultivo da soja, se ocorreu lixiviação para a profundidade de 10-20cm, os níveis dos isômeros e do metabólito foram insignificantes, não sendo possível detectar por meio da metodologia utilizada. Este resultado vem ao encontro da pesquisa realizada por Tornisielo et al.<sup>24</sup>, ao estudarem a quantidade de  $^{14}\text{C}$ -endossulfan lixiviado em solo latossolo roxo. Segundo estes pesquisadores, a quantidade de endossulfan lixiviado é muito pouca e decresce à medida que aumenta a profundidade do solo. Este comportamento também foi constatado por Inomata et al.<sup>11</sup> ao analisarem endossulfan em solo arenoso nas profundidades de 0 a 30cm, 30 a 60cm e 60 a 90cm.

Observa-se que os estereoisômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan e o metabólito sulfato de endossulfan foram maiores na profundidade de 0 a 10cm no solo cultivado com soja, nos tratamentos MIP e convencional, do que na profundidade de 10 a 20cm. Este fato pode ser devido à adsorção do endossulfan nas partículas de solo da camada superficial explicada pelas características lipofílicas deste inseticida. Greve<sup>10</sup> verificou uma isoterma de adsorção do tipo "L" que demonstra alta afinidade entre o inseticida endossulfan e as partículas adsorventes do solo na fase inicial de adsorção. Acrescenta-se, também, que a baixa solubilidade do endossulfan e de seus metabólitos em água contribui para que este inseticida tenha alta adsorção às partículas orgânicas do solo<sup>12, 13</sup>.

Embora o ingrediente ativo endossulfan consista da mistura dos estereoisômeros  $\alpha$ -endossulfan e  $\beta$ -endossulfan na relação de 70% e 30%, respectivamente, no presente estudo

verificou-se que o  $\beta$ -endossulfan foi encontrado em maior proporção no perfil de 0 a 10cm em ambos os tratamentos. Este resultado pode ser justificado pelo fato do  $\beta$ -endossulfan ser uma molécula mais estável. Segundo Lehr<sup>14</sup> o  $\alpha$ -endossulfan é mais susceptível de sofrer degradação, enquanto o  $\beta$ -endossulfan se apresenta como uma molécula mais estável. Este comportamento foi verificado por Byers et al.<sup>3</sup> ao relatar a degradação mais rápida do isômero  $\alpha$  em relação ao  $\beta$ -endossulfan.

Segundo os resultados ilustrados na Figura 1, o sulfato de endossulfan apresentou maior concentração na profundidade de 0 a 10cm do que os isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan no solo cultivado com soja em ambos os sistemas MIP e convencional. O sulfato de endossulfan é o maior produto de degradação no solo, se acumula a taxas compatíveis de degradação de  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan, segundo Milles e Harris<sup>17</sup>. No presente estudo os níveis de resíduos de  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e sulfato de endossulfan na profundidade de 0 a 10cm, no solo cultivado com soja no sistema MIP, apresentaram proporcionalidade de 15%, 33% e 52%, evidenciando coerência com a relação de 7%, 30% e 63%, respectivamente, obtida por Miles e Moy<sup>18</sup> em pesquisas realizadas em solo. Porém, verifica-se que na profundidade de 0-10cm no solo cultivado com soja no sistema convencional, os níveis de  $\alpha$ -endossulfan foram maiores do que de  $\beta$ -endossulfan. Este comportamento pode ser atribuído a possível conversão de  $\beta$ -endossulfan a  $\alpha$ -endossulfan proposta por Miles e Moy<sup>18</sup>.

A maior concentração de sulfato de endossulfan também pode ser devido à degradação microbiana de  $\alpha$ -endossulfan e  $\beta$ -endossulfan favorecido pelo pH do solo de 5,3 e 5,0 nas

profundidades de 0 a 10cm e de 10 a 20cm, respectivamente. Segundo Martens<sup>16</sup>, que estudou extensivamente a degradação oxidativa do endossulfan, nesta faixa de pH os fungos degradam preferencialmente os estereoisômeros do endossulfan para o sulfato de endossulfan.

No presente estudo, os maiores níveis de  $\beta$ -endossulfan encontrado no solo em relação ao  $\alpha$ -endossulfan, na profundidade de 0 a 10cm no sistema MIP, é um resultado favorável considerando-se que a toxicidade daquele isômero é 3,1 vezes menor do que a deste inseticida e do sulfato de endossulfan<sup>9</sup>.

As amostras de solo coletadas nas duas profundidades, um ano após pulverização do inseticida, não apresentaram nenhum resíduo dos isômeros de endossulfan e de seu metabólito. Este resultado está coerente com os estudos realizados por Rao e Murty<sup>22</sup> e Gorbach e Merz<sup>9</sup>. Segundo Rao e Murty<sup>22</sup> o endossulfan possui uma persistência relativamente curta de 100-120 dias e não tem apresentado problemas de resíduos em solos.

Verificou-se, no presente estudo, que a soja cultivada nos sistemas MIP e convencional apresentou um crescimento sadio durante todas as etapas de desenvolvimento. As aplicações de inseticidas nos dois sistemas foram eficientes no controle de pragas.

## CONCLUSÃO

Ambos os sistemas foram eficazes no controle de pragas, todavia como o MIP apresentou menor contaminação de endossulfan no solo, conclui-se que este deve ser o sistema adotado para o cultivo da soja.

Corrêa, C. M. D.; Oliveira, J. J. do V.; Tornisielo, V. L. - Residues of Endosulfan in soil (Latosolo Roxo) cultivated with soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 69 - 75,2003.

**ABSTRACT.** The use of pesticide in agriculture avoid the loss of foods but their residues may contaminated the environmental mainly the soil. This study proposed to evaluate the possible soil contamination by endosulfan and its principal metabolite, endosulfan sulphate. The experiment was carried out with soybean in area of 900m<sup>2</sup> separated in three equal parts: control (without inseticide application), pests integrated management (PIM) and conventional systems, sprayed with 437g i.a./ha e 1312g i.a./ha, respectively. The endosulfan was quantified by gas chromatography with electron capture detector (Ni<sup>63</sup>) seven days and one year after each spray. The endosulfan residues were not detected in the soil (10-20cm) cultivated with soybean in MIP system (10-20cm), within the limit of method quantification [ $\alpha$ -endosulfan (0.005 $\mu$ g/g),  $\beta$ -endosulfan (0.005 $\mu$ g/g) e sulfato de endosulfan (0.1 $\mu$ g/g)]. The total endosulfan residue was 0.06 $\mu$ g/g to PIM in depth (0-10cm) and to conventional 0.14 $\mu$ g/g in (0-10cm) and 0.03 $\mu$ g/g in (10-20cm). After one year, none residue was detected in soil (0-20cm) for two systems. Both treatments were efficient to pests control, however PIM was suggested to use, because it result in low contamination level of soil by endosulfan.

**KEY WORDS.** soil, soybean, conventional and PIM systems, endosulfan

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – ABIOVE. <http://www.abiove.com.br> 1998.
2. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 95/85 de 21 de Novembro de 1985. **Diário Oficial da União**, 22 de Novembro de 1985.
3. Byers, R. A., Woodham, D. W., Bowman, M. C. G. Residue on coastal Bermuda grass, trash and soil with endosulfan. *Journal of the Economic Entomology*, 58: 160-161, 1965. Apud. **World Health Organization**. Endosulfan. Geneva: WHO, 1984. 60p. (Environmental Health Criteria, 40).
4. Costa, S. L. A soja na produção de alimentos. In: **Seminário Nacional de Pesquisa de Soja**, Londrina, 1978. Anais. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária, 1979. v.2, p.235-243.
5. Dores, E. F. G. C., De-Lamonica-Freire, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 9: p. 1-18, 1999.
6. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região Central do Brasil** 1996/97. Londrina, 1996. 164 p.
7. Gelmini, G. A., Novo, J. P. S., Zamoriolli, D. P. **Coletânea de portarias e informações gerais sobre defensivos agrícolas e receituário agrônomo**. 3ª ed., Campinas: CATI, 1986. p. 159-161.
8. Goebel, H., Gorbach, S., Knauf, W., Rimpau, R.H., Hüttenbach, H. **Properties, effects, residues, and analytics of the inseticide endosulfan**. New York, Springer-Verlag, 1982. 174p. (Residues Reviews, 83).
9. Gorbach, S., Merz, H. D. **Residue analysis of endosulfan in the soil of soybean field in Rio Grande do Sul**. 1983, 8p. (não publicado).
10. Greve, P.A. Rapid identification method for endosulfan from GLC peak shifts under the influence of alkali. **J. Agric. Food Chem.**, 19: 372, 1971.
11. Inomata, O. N. K.; Lemes, V. R. R.; Barreto, H. H. Avaliação dos teores de endosulfan em diferentes profundidades do solo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(2): 53-56, 1996.
12. Lehr, W. **Statement concerning soil metabolism and mobility of endosulfan** (Hoe 002671). Frankfurt, Hoechst, 1992a. 8p. (Report, PSR-WLO2/92).
13. Lehr, W. **Statement concerning the hydrolysis and biodegradation of endosulfan in water**. Frankfurt, Hoechst, 1992b. 8p. (Report, PSR-WLO5/92).
14. Lehr, W. **Statement concerning the chemical classification of endosulfan**. Frankfurt, Hoechst, 1993. 3p. (Report, PSR-93/034).
15. Luke, M.A., Froberg, J.E., Masumoto, H.T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate,

- organonitrogen and hidrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 58(5): 1020-1026, 1975.
16. Martens, R. Degradation of [8,9-<sup>14</sup>C]-endossulfan by microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, 31: 853, 1976.
17. Miles, J. R. W., Harris, C. R. Journal Environ. Science Health Bulletin. V. 13, p. 199, 1978. Apud. MILES, J.R.W., MOY, P. Degradation of endossulfan and its metabolites by a mixed of sol culture of soil microorganism. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 23: 13-19, 1979.
18. Miles, J.R.W., Moy, P. Degradation of endossulfan and its metabolites by a mixed of sol culture of soil microorganism. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 23: 13-19, 1979.
19. Oliveira, J. J. V., Toledo, M. C. F. Resíduos de agrotóxicos em morangos. **Pesticidas Revista Técnico Científica**, 5: 95-110, 1995.
20. Racke, K. D. **Pesticides in the soil microbial ecosystem**. In: RACKE, Keneth D., COATS, Joel R. Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. Iowa, Dow Elanco, 1990. 12p.
21. Raij, B. V.; Andrade, J. C.; Cantarella, H.; Quaggio, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agronômico, Campinas, 2001, 285p.
22. Rao, D. M. R., Murty, A. S. Toxicity, biotransformation and elimination of endossulfan in *Anabas testudineus* (Bloch). **Indian Journal of Experimental Biology**, 18: 664-666, 1980.
23. Stumpf, K., Abhaver, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of endossulfan**. Frankfurt, Hoechst, 1986. 23p. (Report B 81/86).
24. Tornisielo, V. L., Pinho, R. S., Monteiro, R. T. R., Costa, M. A. Lixiviação do inseticida <sup>14</sup>C-endossulfan em solos do Estado de São Paulo. **Pesticidas Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 8: 1-8, 1998.

Recebido em 11/04/2001 ; Aprovado em 15/05/2003



## Análise de matérias estranhas em amostras de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., provenientes de sistemas de cultivo nativo e adensado<sup>1</sup>.

Extraneous material in maté, *Ilex paraguariensis* St. Hil., from  
native and compact cultivation systems<sup>1</sup>

Larissa R. BORGES<sup>2</sup>  
Sonia M. N. LAZZARI<sup>3\*</sup>  
Flávio A. LAZZARI<sup>3</sup>

RIALA6/942

Borges, L. R.; Lazzari, S. M. N.; Lazzari, F. A.- Análise de matérias estranhas em amostras de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., provenientes de sistemas de cultivo nativo e adensado<sup>1</sup>. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 77 - 82,2003.

**RESUMO.** A erva-mate é um produto amplamente consumido *in natura*, e deve, portanto, ser livre de contaminação por insetos e outras matérias estranhas a fim de garantir sua qualidade. Com o objetivo de comparar a qualidade sanitária da erva-mate procedente de dois sistemas diferentes de cultivo, foram analisadas, pelo método da flutuação descrito na AOAC em três repetições, duas amostras de erva-mate da área nativa e duas da adensada, além de uma amostra comercial usada como referência. Insetos adultos, larvas, ácaros e pêlos de roedores, cuja tolerância é zero, foram recuperados das amostras. Fragmentos de inseto também excederam o padrão estabelecido pelo Ministério da Saúde. As amostras de erva-mate comercial apresentaram os níveis mais elevados de fragmentos de insetos (73,3 fragmentos/10 g); seguidas pelas amostras da 1ª e 2ª poda da área adensada (38,3 e 66,3) e 1ª e 2ª poda do erval nativo (34,3 e 23,3). Assim, todas as amostras estavam fora dos padrões e seriam condenadas. A adoção de rigorosas medidas sanitárias deveriam ser realizadas na colheita e em todo o processo para a manutenção da qualidade do produto. Uma revisão dos atuais padrões de qualidade também é necessária para adequar os limites de contaminação à realidade da cadeia produtiva da erva-mate.

**PALAVRAS-CHAVE.** entomologia microanalítica, erva-mate, matérias estranhas, sujidades leves

<sup>1</sup> Contribuição nº 1356 do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

<sup>2</sup> Curso de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Bolsista do CNPq. E-mail: borgeslarissa@onda.com.br

<sup>3\*</sup> Depto. de Zoologia da Universidade Federal do Paraná – Caixa Postal 19020, 81531-980 – Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lazzari@bio.ufrpr.br



## INTRODUÇÃO

O mercado da erva-mate tem crescido e se diversificado nas últimas décadas, contudo os avanços no desenvolvimento tecnológico e no controle de qualidade têm sido discretos. As flutuações de demanda deste produto ao longo dos anos indicam a necessidade de modernização do processo de produção que atenda às atuais exigências de qualidade do consumidor final e do mercado<sup>3,8</sup>.

A contaminação da erva-mate industrializada por matérias estranhas, tais como, insetos inteiros e seus fragmentos, ácaros e pêlos de roedores, resulta em produtos de má qualidade, com perda nutricional e calórica, dano estético, depreciação do valor comercial e de risco para a saúde, pois freqüentemente excedem os limites máximos de tolerância estabelecidos pelo Ministério da Saúde para Identidade e Qualidade da Erva-mate, baseada na Portaria nº 234 de 25 de março de 1998 (Tabela 1)<sup>5,9,11,14</sup>.

As matérias estranhas são quaisquer materiais associados a condições ou práticas inadequadas de produção, estocagem ou distribuição, incluindo sujidades (leve, pesada e separada por peneira), material decomposto (tecidos podres devido a causas parasíticas ou não), terra, areia, vidro, partícula metálica ou outras substâncias estranhas, excluindo-se as bactérias. As sujidades são classificadas em leves e pesadas, sendo que as sujidades leves, devido à característica lipofílica, são separadas do produto por flutuação em mistura contendo óleo e água; são exemplos: fragmentos de insetos, insetos inteiros, larvas, pêlos de roedores, bábula de penas, ácaros e seus fragmentos<sup>2</sup>.

Além dos prejuízos quantitativos e qualitativos

provocados diretamente pelos insetos, estes podem criar, como resultado do seu metabolismo e atividades, condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento de fungos. Os fungos podem afetar a qualidade física, sanitária e nutricional da erva-mate, alterando o sabor, odor e aparência do produto, além da produção de micotoxinas que causam severos danos à saúde<sup>10,12,13</sup>.

As sujidades presentes em erva-mate podem ser provenientes da área de cultivo ou da falta de boas práticas de higiene durante a colheita, transporte e beneficiamento da matéria-prima<sup>4</sup>.

O cultivo tradicional da erva-mate é em sistema nativo; caracterizado pela presença de árvores de erva-mate que não foram plantadas pelo homem, portanto não se pode precisar a idade e o espaçamento destes povoamentos. Outra prática comum é o plantio em sistema de sombreamento, sob a cobertura de outras espécies arbóreas, onde o nível de radiação solar é parcial. O erval adensado é o erval nativo, após a retirada da vegetação de pequeno porte e sem valor econômico, acrescido de mudas de erva-mate e geralmente sem espaçamento definido. Atualmente, tem-se praticado também a monocultura, plantando-se somente erva-mate, em áreas extensas, com espaçamento definido e sem cobertura vegetal. Contudo, esta prática tem resultado em sérios problemas com pragas e doenças, em função do desequilíbrio ecológico<sup>1</sup>.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a presença de matérias estranhas ou sujidades leves em lotes de erva-mate provenientes dos sistemas de cultivo nativo e adensado para determinar se as condições de campo com relação à ocorrência de pragas nesses dois ervais afetam a qualidade sanitária do produto final.

**Tabela 1** Legislação para Identidade e Qualidade em erva-mate, *Ilex paraguariensis*, do Ministério da Saúde (Portaria nº 234/1998).

Tipos de Matérias Estranhas	Quantidade
Fragmentos de insetos próprios da cultura	máximo 10/10 g
Fragmentos de outros insetos	ausência em 10 g
Insetos e ácaros inteiros, vivos ou mortos	ausência em 200 g
Excrementos de animais	ausência em 10 g
Pêlos de animais	ausência em 10 g
Sujidades pesadas	máximo 150 mg/10 g
Outras matérias estranhas	ausência em 10 g

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de erva-mate foram coletadas nas podas realizadas em 26 de janeiro de 2001 (safrinha) e 18 de setembro de 2001 (safra) em duas áreas de cultivo de erva-mate, nativo e adensado, em uma propriedade na localidade de Estiva, município de São Mateus do Sul, PR. Após a poda, os dois lotes de folhas da área nativa e adensada foram transportados para uma indústria localizada em São Mateus do Sul – PR, nesta a erva-mate passou pelos processos de sapeco durante 1 minuto a 400°C e pré-secagem por 2 minutos a 80°C – a partir deste ponto as amostras não puderam mais ser processadas na indústria por não ser possível a rastreabilidade do lote e em função da capacidade do maquinário para larga escala somente. A secagem das amostras de erva-mate ocorreu no Setor de Ciências Biológicas, no laboratório do Curso de Pós-graduação em Entomologia por 63 horas a 40°C, realizando-se a trituração em processador de alimentos e a peneiração em tamiz 12 ASTM ou 10 TYLER. As amostras, depois de embaladas em sacos plásticos e etiquetadas, foram transportadas para a Seção de Microscopia Alimentar do Laboratório Central do Estado (Lacen), Curitiba, PR, para análise.

Foram coletadas quatro amostras, sendo duas de erva-mate da área nativa e duas de erva-mate da área adensada. O peso aproximado de cada uma das amostras analisadas foi de 2 Kg, mas a alíquota de trabalho foi de 10 g com três repetições. As análises para detecção de sujidades leves foram realizadas segundo o método da flutuação nº 981.18 descrito na AOAC – 2000<sup>2</sup>. Paralelamente, foi analisada uma amostra de 1 Kg de erva-mate comercial adquirida em um supermercado da região, para se obter um parâmetro comparativo dos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra o número médio de sujidades leves recuperadas pelo método da flutuação em cinco amostras de erva-mate comparadas com o padrão (Portaria 234/1998<sup>5</sup>), estabelecido pelo Ministério da Saúde. Verifica-se que as sujidades leves são de quatro categorias: fragmentos de insetos, insetos inteiros, ácaros e pêlos de roedor (Figura 1).

Recentemente, foram revogadas a Portaria SVS/MS n.º 234, de 25 de março de 1998 e a Resolução ANVS/MS n.º 210, de 17 de junho de 1999<sup>6</sup>, e sendo adotada somente a Resolução - RDC n.º 302, de 07 de novembro de 2002<sup>7</sup>, que estabelece para características macroscópicas e microscópicas a legislação específica, que não existe. Entretanto, neste estudo foi utilizado a Portaria 234/98, pois era esta que vigorava na época.

A amostra comercial apresentou o maior número de sujidades leves, seguida pelos ervais adensado e nativo. Nestes,

as amostras obtidas na segunda poda - período da safra - apresentaram um número maior de matérias estranhas. Uma das razões para tanto, provavelmente, deve-se ao grande aumento no volume de secagem da erva-mate na indústria, expondo mais o produto à contaminação oriunda de outros lotes. No entanto, durante este período a ocorrência das populações de insetos a campo foi baixa, confirmando que a contaminação das amostras era proveniente principalmente da indústria e não do campo com insetos próprios da cultura (Tabela 3). Os resultados das análises são justificados por Borges<sup>4</sup>, que observou uma incidência menor de pragas na área de erval nativo comparada à adensada, pois a maior diversidade de plantas resulta em maior riqueza de espécies de insetos, tanto de espécies fitófagas quanto de predadoras, promovendo um melhor equilíbrio ecológico.

Devido ao tamanho reduzido dos fragmentos de inseto, em função da moagem, há uma grande dificuldade para a identificação dos mesmos, o que limita a adoção deste critério. Considera-se que os fragmentos próprios da cultura da erva-mate não representam grandes problemas como vetores de patógenos, pois, normalmente, não frequentam fontes de contaminação<sup>7</sup>.

As cochonilhas encontradas nas amostras da área nativa (1ª poda) e comercial, são insetos associados à cultura e observados com facilidade devido ao fato dos adultos serem imóveis e permanecerem aderidos às folhas.

O inseto da ordem Thysanoptera, observado em área adensada (2ª poda), pode ser fitófago de diversos tipos de plantas ou predadores de pequenos artrópodos como ácaros, pulgões e cochonilhas.

Os pêlos de roedor encontrados na amostra comercial são os que representam o maior problema sanitário, pois podem ser provenientes do erval, onde as folhas colhidas são colocadas diretamente no chão ou por contaminação durante o transporte, processamento ou armazenamento na indústria.

Os ácaros da Ordem Oribatida foram encontrados nas amostras comercial e nativa (1ª e 2ª poda). Esses ácaros são particularmente comuns em solos de florestas e não estariam relacionados com o ambiente de armazenamento.

Não se pode afirmar, com base nas matérias estranhas encontradas, qual a fonte exata da contaminação, entretanto, algumas melhorias podem ser feitas ao longo de todo o processamento pelo qual a erva-mate é submetida. Nos ervais, deve-se utilizar pano de colheita ou poncho (com fios de ráfia) evitando dessa maneira o contato com o solo, onde pode haver ácaros, pêlos de roedores e esterco, entre outros. Na indústria, o controle de qualidade aliado às boas condições de higiene, principalmente na época da poda, quando o volume de erva-mate processada é muito grande, podem reduzir muito a contaminação.

**Tabela 2** – Número médio de sujidades leves recuperadas de amostras de erva-mate, *Ilex paraguariensis*, provenientes de sistemas de cultivo nativo e adensado em São Mateus do Sul, PR, comparadas com uma amostra comercial e com o padrão estabelecido pelo Ministério da Saúde.

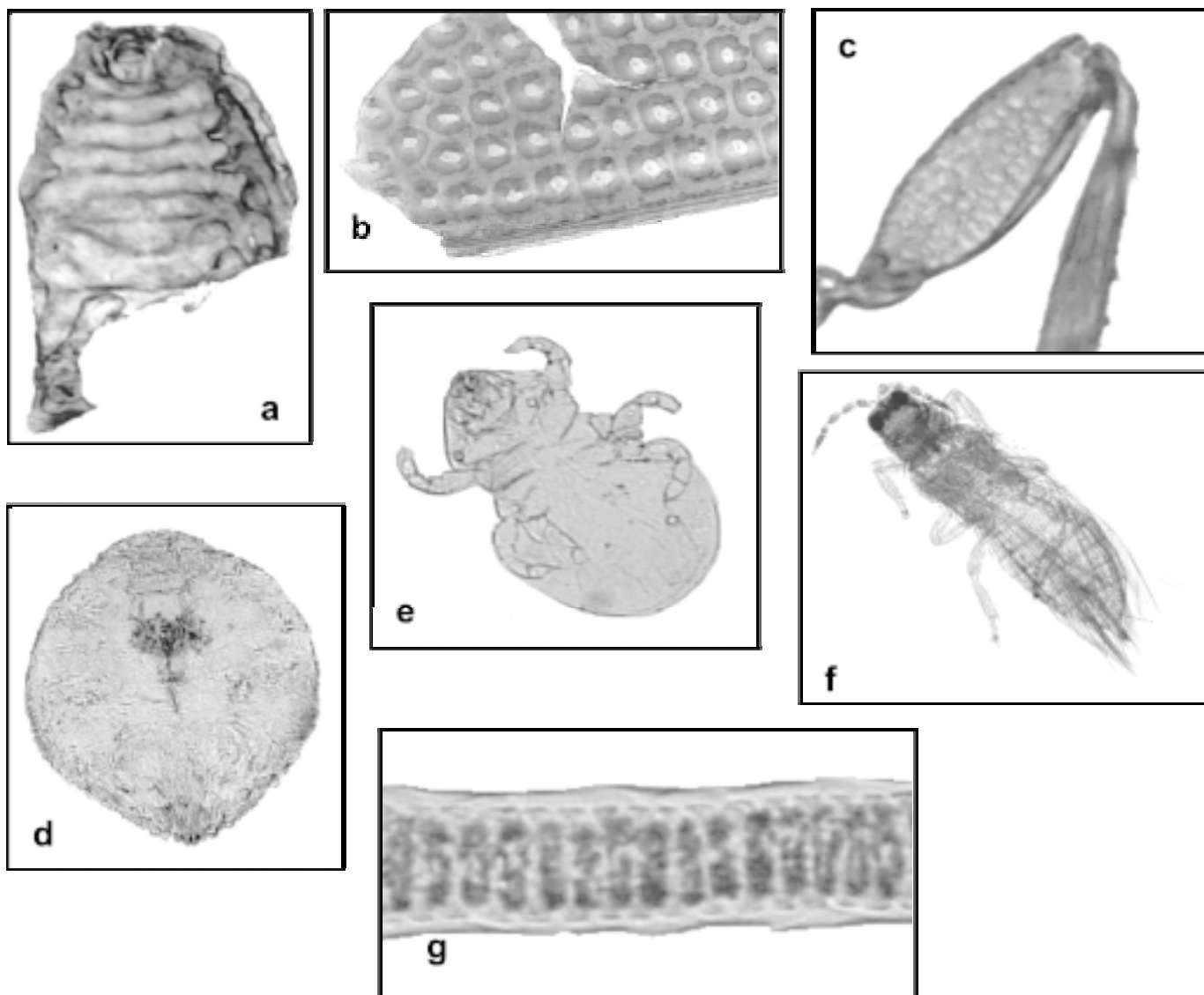
Tipo de sujidades	Número médio de sujidades*					
	Padrão	Comercial	1 <sup>a</sup> poda**		2 <sup>a</sup> poda**	
			Nativo	Adensado	Nativo	Adensado
Fragmentos de inseto próprio da cultura	<b>10/10 g</b>	73,66	23,33	38,33	34,33	66,33
Inseto inteiro	<b>0/200 g</b>	0,33	0,33	-	-	0,33
Ácaro	<b>0/200 g</b>	1,33	0,33	-	1,00	-
Pêlo de roedor	<b>0/200 g</b>	0,66	-	-	-	-

\* Média das 3 repetições de 10 g/tratamento

\*\* Podas realizadas em janeiro/2001 e setembro/2001, respectivamente.

**Tabela 3** - Sujidades leves recuperadas em amostras de erva-mate, *Ilex paraguariensis*, comercial e procedentes de sistemas de cultivo nativo e adensado, São Mateus do Sul, PR, 2001.

Tipo de sujidade	Quantidade	Amostra
Cochonilha (Hemiptera)	1	Comercial
	1	Área Nativa (1 <sup>a</sup> poda)
Trips (Thysanoptera)	1	Área Adensada (2 <sup>a</sup> poda)
Ácaro terciário (Oribatida)	4	Comercial
	1	Área Nativa (1 <sup>a</sup> poda)
	3	Área Nativa (2 <sup>a</sup> poda)
Pêlo de roedor	2	Comercial



**Figura 1** – Sujidades recuperadas em amostras de erva-mate, *Ilex paraguariensis*, pelo processo da flutuação: a. Abdome; b. Élitro; c. Perna; d. Cochonilha; e. Ácaro; f. Trips; g. Pêlo de roedor. Fotos: Larissa Rolim BORGES

### CONCLUSÃO

De acordo com a Portaria 234/1998, todas as amostras seriam condenadas pela presença de fragmentos de inseto acima dos limites de tolerância, assim como pela presença de outras sujidades leves;

A amostra que apresentou maior número de fragmentos de insetos foi a de erva-mate comercial, seguida das provenientes do erval adensado e nativo. Em ambos, as amostras obtidas na segunda poda apresentaram maior número de contaminantes;

Devido ao fato de não existir uma legislação específica para padrões de qualidade (macroscópicos e microscópicos) em erva-mate, sugere-se que seja realizada uma revisão para adequar os limites de contaminação à realidade da cadeia produtiva.

Para esta revisão, deveriam ser realizados estudos que interrelacionem o tipo de fragmento de inseto com possíveis doenças causadas por este. Entretanto, é importante haver ausência de pêlos de roedor, ácaros e insetos não próprios da cultura como baratas e moscas em função do risco potencial destes para a saúde e dos males que podem acarretar quando ingeridas.

### AGRADECIMENTOS

O Projeto foi desenvolvido com apoio do CNPq. Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), na pessoa de Silvana Bosquiolo pelo apoio na realização das análises; à Seção de Microscopia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e à Indústria Baldo Comércio e Exportação de Erva-Mate na pessoa de Leandro B. Gheno.

Borges, L. R.; Lazzari, S. M. N.; Lazzari, F. A. - Extraneous material in maté, *Ilex paraguariensis* St. Hil., from native and compact cultivation systems<sup>1</sup>. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 77 - 82,2003.

**ABSTRACT.** Maté is a product consumed mostly *in natura*, and must, therefore, be free of insect or extraneous material in order to guarantee its quality. In order to compare the sanitary quality of the maté produced by two different cultivation systems, (native and high tree density), processed leaves were analyzed by the flotation method. A commercial sample was used for comparison; the test was done in three replicates. Adult insects, larvae, mites, and rodent hairs, for which tolerance is zero, were recovered from the samples. Insect fragments also exceeded the standard established by the Ministry of Health, which is 10 fragments/10 g. The commercial maté presented the highest levels of insect fragments (73,3 fragments/10 g); followed by the samples from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> pruning from the dense area (66,3 and 38,3) and the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> from the native (34,3 and 23,3). Thus, all samples were low grade and should be rejected. Rigorous sanitation measures, from harvesting through processing, must be adopted in order to keep the sanitary quality of the product. A revision of current quality standard is also required to adapt the contaminant limits to the reality of the maté production chain.

**KEY WORDS.** maté, microanalytic entomology, extraneous material

## REFERÊNCIAS

1. Andrade, F.M. Exploração e utilização do recurso *Ilex paraguariensis* St. Hil. – erva-mate, seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidades de manejo sustentável. In: **I Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica**. São Paulo, Ed. dos Organizadores, 1999. p. 24-33.
2. Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods of Analysis**. Ed. Washington, DC, 2000. 17<sup>a</sup> ed., p. 8.
3. Bassani, V.L.; Campos, A.M. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil, Aquifoliaceae (erva-mate) visando a exploração do potencial vegetal como fonte de produtos. In: **I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-mate**. Ed. dos Organizadores, 1997. p. 69-87.
4. Borges, L.R. **Flutuação populacional de insetos em dois sistemas de cultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., e análise de sujidades no produto final**. Curitiba, 2002. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná].
5. Brasil. Leis e decretos. 1998. Portaria nº 234. **Diário Oficial** de 25 de março de 1998. Brasília.
6. Brasil. Leis e decretos. 1999. Resolução nº 210. **Diário Oficial** de 17 de junho de 1999.
7. Brasil. Leis e decretos. 2002. Resolução - RDC nº 302. **Diário Oficial** de 07 de novembro de 2002.
8. Burgardt, A. C. **Desenvolvimento de uma bebida, utilizando extrato de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba, 2000. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná].
9. Gorhan, J.R. The significance for human health of insects in food. **Ann. Rev. Entomol**, 24: 209-224, 1979.
10. Lazzari, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Ed. do Autor. Curitiba; 1997. 134p.
11. Martini, M.H.; Batistuti, J.P. Sujidades leves em sopas desidratadas - adequação de um método microscópico. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 57: 35-44, 1998.
12. Vargas, C.H.B. **A entomologia analítica na verificação das condições higiênicas de matérias-primas e de produtos agrícolas industrializados**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba; 1994. 147p.
13. Vargas, C.H.B.; Almeida A.A. Comparação de métodos para pesquisa de sujidades leves e verificação das condições higiênicas de farinhas de trigo especial. **Bol. CEPPA**, 14: 65-76, 1996.
14. Zamboni, C.Q. et al. Sujidades e fraudes em chocolates. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 48: 37-41, 1988.

Recebido em 13/08/2002 ; Aprovado em 15/05/2003

## Inquérito sorológico, após epidemia de Dengue. Paraíso – São Paulo.

### Serological survey after Dengue outbreak Paraíso city – São Paulo state

Sirle A. S. SCANDAR<sup>1\*</sup>  
Rubens P. CARDOSO JUNIOR<sup>1</sup>  
Paulete GOLDENBERG<sup>2</sup>  
Ivani B. FERREIRA<sup>3</sup>  
Luiza T. M. DE SOUZA<sup>3</sup>

RIALA6/943

Scandar, S. A. S. et al - Inquérito sorológico, após epidemia de Dengue. Paraíso – São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 83 - 89,2003.

**RESUMO.** O estudo em questão teve como objetivo dimensionar a incidência da infecção de dengue, no município de Paraíso – SP, por ocasião da epidemia ocorrida em abril de 1993. O inquérito sorológico apresentou uma incidência de 3,7% indicando que aproximadamente 180 pessoas teriam sido infectadas pelo vírus durante a epidemia, mostrando assim uma relação de 1:12, isto é, para cada caso diagnosticado laboratorialmente, existiram 11 sem diagnóstico. Detectou-se relação entre sintomatologia e sorologia positiva, sendo os sintomas mais referidos a febre, dor de cabeça e dor no corpo. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas, em relação à idade, sexo, ocupação e nível sócio-econômico. Destaca-se ainda que, dos indivíduos positivos detectados pelo inquérito sorológico, 33,0% não referiram sintomas.

**PALAVRAS-CHAVE.** Dengue, *Aedes aegypti*, epidemia, sorologia, ELISA.

Endereço para correspondência:

1 – Superintendência de Controle de Endemias

\* Av. Philadelpho M. Gouveia Neto, 3101, 3º andar, São José do Rio Preto, SP 15060-040, Brasil.

2 – Universidade Federal Paulista de Medicina. Rua Pedro de Toledo, 675 Vila Clementino,

CEP – 04039032, São Paulo – Brasil

3- Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira Cesar, São Paulo Brasil.

## INTRODUÇÃO

Dengue é uma infecção viral aguda provocada por um dos quatro sorotipos de vírus (DEN 1, 2, 3 e 4) e transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente das espécies *aegypti* e *albopictus*.

Clinicamente, manifesta-se como uma doença infecciosa aguda caracterizada por um amplo quadro de sinais e sintomas que variam desde infecção assintomática ou febre indiferenciada até gravíssimos casos de diátese hemorrágica e choque, de elevada letalidade<sup>1</sup>. A doença pode apresentar-se sob duas formas: Dengue Clássico e Dengue Hemorrágico (FHD)/ Síndrome de Choque do Dengue (SCD). O Dengue clássico caracteriza-se por febre alta de início abrupto, cefaléia severa, dor retro-orbital, dores musculares e articulares e erupção cutânea, podendo ocorrer alguns fenômenos hemorrágicos sem maiores conseqüências<sup>11,16</sup>. O FHD / SCD é caracterizado por febre alta, inicialmente indiferenciável e apresentando, com frequência, insuficiência circulatória com ou sem choque<sup>11,6</sup>.

No Estado de São Paulo houve a introdução do Dengue tipo 1, confirmado laboratorialmente, a partir do verão de 1990/1991.

O Serviço Regional – 08 da Sucen, que abrange 101 municípios, tem sede no município de São José do Rio Preto, e setores (unidades menores ligada à sede regional) sediados nos municípios de Catanduva, São José do Rio Preto, Votuporanga e Jales vêm registrando epidemias de dengue desde 1991. No final de 1992 havia uma grande preocupação em saber exatamente a dimensão das epidemias que vinham ocorrendo, prevenindo-se tendência de aumento no número de casos. De um lado essa preocupação se justificava devido ao caráter explosivo da doença, diante da falta de tratamento específico, da não-existência de vacinas e das dificuldades de combater os vetores e, de outro, a possibilidade da população já sensibilizada pela exposição se tornar vulnerável a FHD / SCD.

Diante dessas preocupações, nos propusemos a realizar inquérito sorológico com o objetivo de identificar casos positivos assintomáticos e/ou aqueles que, tendo apresentado sintomas durante a vigência da transmissão, não procuraram o serviço de saúde. Outro objetivo foi estimar a incidência da infecção por Dengue, caracterizando a frequência da mesma segundo sexo, idade, ocupação, sintomas e valor imobiliário na população estudada.

Tal investigação que se constitui no objeto do presente estudo se circunscreveu ao município de Paraíso - SP, com população de 4900 habitantes, o qual registrou pela primeira vez transmissão de Dengue em abril de 1993, com 15 casos positivos detectados pela vigilância clínica – epidemiológica e confirmados por laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de sangue e informações dos participantes, foram realizadas na segunda quinzena do mês de maio e primeira

semana de junho de 1993.

Nos 90 bairros existentes no município, foi sorteada uma casa em cada bairro, para se obter maior dispersão das amostras. Em média, cada bairro tinha 10 casas, e a média de indivíduos por casa era de 4,5. O sorteio das casas, para se obter uma maior aleatoriedade, foi realizado em campo no momento da pesquisa.

As técnicas laboratoriais utilizadas na pesquisa de anticorpos para Dengue foram o teste imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA) e a reação de inibição da hemaglutinação (HI).

O ELISA de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) apresenta vantagens sobre o HI, é de fácil execução, necessita apenas de uma amostra de soro/sangue dos pacientes e evidencia infecções recentes (até no máximo 90 dias). O HI, no caso de inquérito sorológico, uma amostra de sangue/soro é suficiente, na medida em que aponta a presença de anticorpos IgG, indicando que o indivíduo teve contato com a doença. A reação é considerada uma técnica clássica, ainda muito utilizada em inquéritos sorológicos<sup>10,13</sup>.

Microplacas de poliestireno com 96 orifícios, de fundo chato, (Costar - Corning, NY, USA) foram sensibilizadas com anti - IgM humano (Sigma, Chemical, St Louis, USA). As amostras de soros humanos em teste foram diluídas a 1/40 em *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4 com 0,5 % de albumina bovina (Sigma, Chemical, St Louis, USA). A seguir um “pool” de antígenos, dos vírus do Dengue sorotipos 1 e 2, contendo 16 unidades hemaglutinantes, foi adicionado. Esses antígenos foram produzidos a partir de cérebro de camundongos albinos Swiss lactentes infectados e preparados pelo método de extração da sacarose – acetona. O sistema de revelação da reação foi constituído de um conjugado anti-flavivírus marcado com peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories) e do cromógeno ABTS ( 2,2 – azino- di-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid, Kirkegaard & Perry Laboratories – KPL, Gaithersburg, MD, USA). Para leitura de DO utilizou-se um ELISA Titertek Multiskan, filtro 414 nm<sup>9</sup>. O Valor do Limite de Reatividade (“cut off”) foi 0,200. Toda amostra de soro cujo valor de DO<sup>14</sup> fosse maior ou igual a 0,200, foi considerada positiva. O Limite de Reatividade foi calculado utilizando-se a média dos valores de DO de amostras negativas somada a três vezes o desvio padrão.

Para a pesquisa total de anticorpos principalmente IgG, utilizou-se HI, com 4 unidades hemaglutinantes de antígenos para Dengue 1 e 2. Todas as amostras em teste foram tratadas com acetona PA e adsorvidas com hemácias de ganso. Considerou-se positiva a amostra que apresentou título maior ou igual a 1/20 para um dos antígenos de Dengue<sup>17</sup>.

A presença de reações positivas por MAC-ELISA e HI permitiu selecionar o participante como soropositivo.

Também coletou-se dados dos participantes tendo em vista identificar o padrão de distribuição de dengue na população estudada. Nesse sentido, obteve-se idade, sexo, ocupação, nível sócio-econômico e sintomatologia dos participantes de acordo

com recomendações preconizadas pela Organização Mundial de Saúde<sup>12, 14</sup>.

As coletas de sangue e a obtenção das informações foram realizadas pelos funcionários da Unidade Básica de Saúde local.

A classificação por idade, foi codificada de 5 em 5 anos e para efeito de análise, de 20 em 20 anos.

Quanto à ocupação, os participantes foram inquiridos buscando, identificar se estavam ou não inseridos no mercado de trabalho. As ocupações foram categorizadas segundo a Classificação Brasileira de Ocupações (CBO), de acordo com os grandes grupos, posteriormente reagrupados, tendo em vista destacar o exercício profissional relacionado com atividades rurais, urbanas, bem como as atividades domésticas.

Procurando identificar a ocorrência de casos sintomáticos e assintomáticos, não detectados pela vigilância epidemiológica, foi registrada a presença de pelo menos um dos seguintes sintomas: febre, dor de cabeça, dor no corpo, vermelhidão, dor nas juntas, dor retro-ocular e fraqueza, no período de epidemia entre indivíduos que não procuraram a Unidade Básica de Saúde. Essas informações foram obtidas no caso das crianças, junto às mães ou aos responsáveis.

No intuito de identificar a existência da relação com o nível econômico dos indivíduos acometidos por Dengue, verificou-se o padrão de moradia dos indivíduos que participaram de pesquisa, levando-se em conta o valor imobiliário, em reais. As casas foram classificadas nos seguintes níveis:

- A acima de R\$ 100.000
- B de R\$ 60.000 a R\$ 99.000
- C de R\$ 30.000 a R\$ 59.000
- D abaixo de R\$ 29.000

A estimativa da ocorrência de dengue na amostra, para o período de abril a maio, foi calculada através da fórmula: número de casos positivos divididos pela população amostral vezes 100.

A incidência da infecção por Dengue foi caracterizada segundo idade, sexo, ocupação, nível sócio-econômico e sintomatologia. A relação entre positividade no teste sorológico e os outros dados foi aferida utilizando-se a estatística  $X^2$  e teste exato Fisher aceitando-se  $P < 0,05$ .

Também, comparou-se a estimativa de Dengue obtida pelo inquérito sorológico com as informações da vigilância epidemiológica.

Expandindo-se os dados de positividade para a população do município em 1993, estimou-se a ocorrência total para o município, tendo em vista dimensionar a magnitude da epidemia.

## RESULTADOS

Na tabela 1 mostramos a positividade no teste sorológico associado a dados dos participantes. Observa-se a presença de 42,1% de integrantes do sexo masculino, ou seja, uma relativa supremacia da proporção de mulheres.

Quanto à faixa etária, 30,1% da população amostral tinha menos de 19 anos; 33,0% entre 20 a 39 anos; 25,9% entre 40 a 59 anos; e, 11,0% entre os integrantes com 60 anos e mais.

Com relação à ocupação, integravam a amostra 21,8% de trabalhadores urbanos; 23,2% de trabalhadores rurais e 55,0% de aposentados e donas de casa, constituindo o segmento da população não economicamente ativa.

No que diz respeito ao valor imobiliário das habitações, 74,8% dos indivíduos viviam em imóveis com valor menor ou igual a R\$ 60.000 reais e 25,2% viviam em imóveis acima desse valor.

A presença de sintomas sugestivos de Dengue foi referida por 13 (3,2%) dos 409 indivíduos integrantes da amostra.

O levantamento sorológico, conforme a tabela 2, revelou positividade de 3,7%.

Relacionando a positividade da reação sorológica com as variáveis estudadas (tabela 1) constatamos distribuição semelhante por gênero, ou seja, a soropositividade foi de 3,5% no segmento masculino e 3,8% no feminino, ressaltando-se que essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

No que concerne à idade, a porcentagem de soropositividade variou em torno de 2,0% na população com menos de 40 anos de idade; este valor dobrou (4,7%) na faixa de 40 a 59 anos; e, subiu para 8,9% entre os participantes da amostra com 60 anos e mais. Apesar das variações observadas, não foram encontradas diferenças significantes entre as porcentagens de soropositividade nas faixas de idade mencionadas.

Com relação à ocupação, a soropositividade entre os indivíduos que trabalhavam na zona urbana foi de 4,5%; entre os que trabalhavam na zona rural a proporção foi de 3,1%; e, entre os aposentados e donas de casa essa proporção foi de 3,6%. As diferenças encontradas de soropositividade não foram estatisticamente significantes ( $p = 0,882$ ).

Constatamos pequenas variações de soropositividade segundo o nível sócio-econômico, considerado a partir do valor imobiliário (em reais) da habitação: 3,9% de positividade entre moradores de imóveis com valor menor que 60.000 reais e 3,7% entre moradores de imóveis acima desse valor. Aqui também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, evidenciando que a doença ocorreu de forma imparcial na população do município.

Do total dos indivíduos investigados, 13 apresentaram sintomas e, destes, 10 (76,9%) eram soropositivos, enquanto entre os 396 integrantes da amostra que não referiram sintomas, somente 1,3% apresentaram sorologia positiva para Dengue. Essas diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ ), evidenciando um número substancial de indivíduos (66,7%) com soropositividade e sintomatologia presentes na amostra, que não utilizaram os serviços de saúde.

Os sintomas registrados na tabela 3, (febre, dor de cabeça, dor nas juntas, dor retro-ocular, exantema e fraqueza), embora comuns a várias doenças, apresentaram associação estatisticamente significativa com a positividade sorológica.



**Tabela 1** - Soropositividade (%) para dengue segundo sexo, idade, ocupação, valor imobiliário e sintomas. Município de Paraíso, 1993

Variáveis	Total de Examinados		Positivos		Teste	Valor de p
	Nº	%	Nº	%		
<b>Sexo</b>						
Masculino.	172	42,1	6	3,5	Fisher	P=0,869
Feminino	237	57,9	9	3,8		
Total	409	100,0	15			
<b>Idade</b>						
Até 19 anos	123	30,1	3	2,4	qui-quadrado	p=0,1628
De 20 a 39	135	33,0	3	2,2		
De 40 a 59	106	25,9	5	4,7		
+ de 60 anos	45	11,0	4	8,9		
Total	409	100	15			
<b>Ocupação</b>						
Trabalhador urbano	89	21,8	4	4,5	qui-quadrado	p=0,882
Trabalhador rural	95	23,2	3	3,1		
Aposentados/domésticos	225	55,0	8	3,6		
Total	409	100	15			
<b>Valor Imobiliário (em reais)</b>						
< 60.000 reais	306	74,8	11	3,9	Fisher	p=0,5476
> 60.000 reais	103	25,2	4	3,7		
Total	409	100	15			
<b>Sintomas</b>						
Sim	13	3,2	10	76,9	Fisher	p<0,0001*
Não	396	96,8	5	1,3		
Total	409	100	15			

\* Valor significativo ao nível de 5%

## DISCUSSÃO

No inquérito sorológico, os 15 casos diagnosticados pelos testes de Mac-Elisa e Inibição da Hemaglutinação na amostra (409 indivíduos), permitiram estimar uma taxa de soropositividade de 3,7%. Supondo que a proporção de infecção da população geral seria igual à proporção de infecção dos indivíduos incluídos no estudo, a projeção desses valores indicaria a presença de 180 pessoas infectadas pelo vírus do Dengue durante a epidemia no município de Paraíso. Dando conta da real extensão da infecção, esses resultados apontariam para um valor muito acima do número de doentes que acessaram os serviços convencionais de saúde (que foram 28 indivíduos,

dos quais 15 foram positivos, e nenhum desses indivíduos participou deste inquérito sorológico). Portanto, no município de Paraíso (4900 hab.) observou-se uma relação de 1:12, entre casos diagnosticados e sem diagnóstico.

Em países asiáticos a positividade encontrada entre grupo de mulheres de maneira geral era superior ao observado entre os homens<sup>2,15</sup>. No Brasil, alguns estudos têm mostrado essa diferença como o inquérito em Araguaína – TO<sup>18</sup>, que identificou maior positividade em mulheres do que em homens, em outros onde essa diferença não foi observada, como no estudo realizado em Ribeirão Preto<sup>3</sup>. O presente estudo, à semelhança desse último, também, não mostrou diferença de positividade entre homens e mulheres.

**Tabela 2 – Soropositividade na população amostral (%). Município de Paraíso, 1993.**

Resultado	Nº	%
Positivo	15	3,7
Negativo	394	96,3
Total	409	100

Da mesma forma, no que concerne à idade, era esperado que ocorresse maior positividade em crianças do que em adultos, como aconteceu em Cuba e em outros países<sup>6,7,8</sup>. No presente estudo, observou-se um aumento de positividade com o avanço da idade, embora as diferenças observadas não fossem estatisticamente significantes.

De forma correlata, em relação a atividade ocupacional, esperava-se que fosse maior a incidência de positividade entre os aposentados, crianças e donas de casas, dado o hábito domiciliar do vetor, porém, esta expectativa não se confirmou, talvez por se tratar de município de pequeno porte, onde o local de residência e local de trabalho apresentavam características semelhantes no que se refere as condições que favoreceram a proliferação do vetor.

A incidência da infecção neste estudo não apresentou relação com o nível sócio-econômico, aferido pelo valor imobiliário, provavelmente por ser o município de pequeno porte, com casas de nível sócio-econômico distintas, mas inseridas de forma aleatória dentro da área urbana.

O estudo detectou relação entre sintomatologia e sorologia positiva, sendo os sintomas mais referidos, febre, dor de cabeça e dor no corpo. Esses dados põem em evidência a presença de um grande contingente de doentes que não são detectados pela rede de saúde, conforme referido anteriormente. Se o caráter pouco específico desses sintomas pudesse ser aventado na explicação do fato, ressalta-se a importância de explorar tal eixo na divulgação de informações aos serviços de saúde e população, visando maior sensibilidade do sistema de vigilância.

Destaca-se que dos 15 indivíduos positivos detectados pelo inquérito sorológico, cinco(33,0%) não referiram sintomas. Esse aspecto é de importante consideração, uma vez que a vigilância epidemiológica passiva existente no Estado de São Paulo<sup>16</sup> está apoiada no diagnóstico clínico, e, neste caso, a presença de casos assintomáticos não seja detectada prejudicando a implementação das ações de controle do vetor com abrangência mais ampla possível em municípios com transmissão da doença.

Considerando o percentual de assintomáticos verificado no inquérito, dos 180 casos estimados de infecção para a população do município de Paraíso, 60 não teriam apresentado sintomas, contingente este nada desprezível, levando-se em

conta, particularmente, a dificuldade de cobrir cidades de grande porte com ações de vigilância epidemiológica e controle do vetor.

## CONCLUSÕES

A realização do inquérito sorológico em 409 indivíduos, terminada a epidemia, possibilitou estimar uma taxa de soropositividade de 3,7% indicando que aproximadamente 180 indivíduos foram infectados pelo vírus do Dengue, enquanto apenas 15 casos foram confirmados pela vigilância epidemiológica (8,3% dos indivíduos infectados). Os 91,7% não notificados, provavelmente, foram assintomáticos, ou não procuraram os serviços de saúde.

Esses dados indicam que a maioria da população de Paraíso continua vulnerável à Dengue. Se uma epidemia de Dengue com outro sorotipo viral atingir o município de Paraíso, os 180 indivíduos que tiveram Dengue correrão um risco maior de apresentar Dengue Hemorrágico, se vierem a se infectar.

O estudo apontou para uma relação entre positividade e a presença de sintomas (particularmente febre, dor no corpo e dor de cabeça), que sinalizou para a presença de 67% de casos sintomáticos não detectados pela vigilância clínico-epidemiológica, além de significativa (33%) proporção de casos assintomáticos. A importância epidemiológica dessas infecções assintomáticas é grande, pois esses indivíduos são fonte de infecção para *Aedes aegypti*, isto é, ajudam na dispersão do vírus e, como não procuram atendimento médico, esses casos obviamente não são notificados, dificultando o direcionamento adequado das ações que visam interromper a transmissão.

Não foram encontradas diferenças significativas de positividade segundo sexo, idade, ocupação e nível sócio-econômico na amostra da população trabalhada no inquérito sorológico, o que indica que a exposição dos diferentes grupos ao vetor deve ter sido semelhante.

Destaca-se a relevância da realização de inquéritos sorológicos, no sentido de melhor conhecer a real extensão de infectados, como recurso adicional de monitoramento em períodos interepidêmicos, permitindo uma avaliação mais adequada dos resultados do programa de prevenção e controle da doença, bem como do risco de dengue hemorrágico a que a população está submetida.

**Tabela 3** - Positividade Sorológica segundo sintomatologia (fraqueza, dor retro ocular, dor nas juntas, exantema, dor no corpo, dor de cabeça e febre). Município de Paraíso, 1993.

Variável	Total de Examinados		Positivos		Teste	Valor de p
	Nº	%	Nº	%		
<b>Fraqueza</b>						
Sim	1	0,24	1	6,67	Fisher	0,0366
Não	408	99,76	14	93,33		
<b>Dor retro-ocular</b>						
Sim	3	0,73	2	13,33	Fisher	0,0036
Não	406	99,27	13	86,67		
<b>Dor nas juntas</b>						
Sim	3	0,73	3	20	Fisher	0,0000
Não	406	99,27	12	80		
<b>Exantema</b>						
Sim	5	1,22	5	33,33	Fisher	0,0000
Não	404	98,78	10	66,67		
<b>Dor no corpo</b>						
Sim	10	2,44	7	46,67	Fisher	0,0000
Não	399	97,56	8	53,33		
<b>Dor de cabeça</b>						
Sim	9	2,2	7	46,67	Fisher	0,0000
Não	400	97,8	8	53,33		
<b>Febre</b>						
Sim	12	2,93	9	60	Fisher	0,0000
Não	397	97,07	6	40		

### AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – Central pelo apoio técnico e principalmente à técnica de laboratório Sandra Regina Mayer pela colaboração na realização dos testes MAC-

ELISA e HI.

Aos funcionários da Unidade Básica de Saúde do município de Paraíso pela colaboração na coleta do material encaminhado para exame.

A bolsista da FUNDAP Samara Hernandez e ao funcionário da SUCEN José Luiz de Souza pela colaboração na coleta de dados.

Scandar, S. A. S. et al - Serological survey after dengue outbreak Paraíso City – São Paulo state. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 83 - 89,2003.

**ABSTRACT.** This study aims at measuring the dengue fever infection incidence in Paraíso City in the state of São Paulo due to an outbreak occurred in April, 1993. The serological survey showed an incidence of 3,7%, which indicates that approximately 180 people could have been infected by the virus during the outbreak. These data show that the symptomatic ratio is of 1:12, that is, for each case laboratorially diagnosed there were 11 without any diagnosis. A relationship between symptomatology and positive serology was found. Symptoms such as fever, headache and sore muscles were the most recalled ones. There was no statistically significant difference regarding age, sex, occupation and social-economical level. It is also important to highlight that 33% of the positive individuals detected by the survey didn't report any symptom.

**KEY WORDS.** Dengue, *Aedes aegypti*, epidemic, serology, ELISA

### REFERÊNCIAS

1. Bravo, T.C. et al. Ecologia del Dengue y el *Aedes aegypti*. Investigación Preliminar. **Salud Pública Méx.**, 26(suppl. 1): 63-76, 1984.
2. Fan, W.F. et al. The Reemergence of Dengue in China. **Rev. Infect. Dis.**, 4: 847-53, 1989.
3. Figueiredo, L.T.M. et al. Encuesta Serológica sobre el Dengue en Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, 118(suppl. 6): 499 – 509, 1995.
4. Gubler, D. J. Vigilancia Activa del Dengue y de la Fiebre Hemorrágica del Dengue. **Bol. of Sanit. Panam.**, 107(suppl. 1): 22 - 31. 1989a.
5. Gubler, D.J.; Costa-Valez, A. A Program for Prevention and Control Epidemic Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. **Bull. PAHO**, 25(suppl. 3): 237-47, 1991.
6. Guzman, M. G. et al. Dengue Hemorrhagic Fever in Cuba I. Serological Confirmation and Clinical Diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 78(suppl. 2): 235-8, 1984.
7. Guzman, M. G. et al. Dengue en Cuba : Historia de una epidemia. **Rev. Cubana Med. Trop.**, 40(suppl. 2): 29-49, 1988.
8. Kouri, G. et al. Dengue hemorrágico en Cuba. Crónica de una epidemia. **Bol. Of. Sanit. Pan.**, 100: 322-8, 1986.
9. Kuno, G.; Gomez, I.; Gubler, D.J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 36: 153 -59, 1987.
10. Monath, T. P.; Heinz, F.X. **Flaviviruses**. 3rd. ed. Philadelphia, Lippincott - Raven Publishers, 1996. p.961-1054: Fields Virology.
11. Organização Mundial da Saúde. **Dengue Hemorrágico: Diagnóstico, Tratamento e Controle**. Genebra, 1987.
12. Organización Mundial de la Salud. **Encuestas Serológicas múltiples y Bancos de la OMS para Sueros de Referencia**, 454: 104 , 1970. (Serie de Informes Técnicos).
13. Organização Panamericana de la Salud. Resurgimiento del dengue en las Américas. **Boletín Epidemiológico**, 18(suppl. 2), 1997.
14. Orenstein, W. A., et al. Field Evaluation of Vaccine Efficacy. **Bull. W.H.O** , 639(suppl. 6): 1055 - 68, 1985.
15. Qiu, F. X. et al. The First Epidemic of Dengue Hemorrhagic Fever in the Peoples Republic of China. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 44(suppl. 4): 364 - 70, 1991.
16. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância Epidemiológica do dengue**. São Paulo, 1987a.
17. Shope, R. E. The use of micro – hemagglutination - inhibition test to follow antibody response after arthropod – borne virus infection in a community of forest animals. **An. Microbiol.**, 11: 167-71, 1983.
18. Vasconcelos, P.F.C. et al. Epidemia de Febre Clássica de Dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 35(suppl. 2): 141-48, 1993.

Recebido em 13/09/2002 ; Aprovado em 15/05/2003



## Red cell glutathione reductase saturation obtained with oral riboflavin supplementation

### Saturação da glutathione redutase eritrocitária obtida pela suplementação oral com riboflavina

Marilena OSHIRO<sup>1\*</sup>  
Kimiyo NONOYAMA<sup>1</sup>  
Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA<sup>2</sup>  
Orlando César de O. BARRETTO<sup>3</sup>

RIALA6/944

Oshiro, M. et al. - Red cell glutathione reductase saturation obtained with oral riboflavin supplementation  
**Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 91 - 94,2003.

**ABSTRACT.** The erythrocyte glutathione reductase (E-GR) saturation with its coenzyme flavin adenine dinucleotide (FAD) affords the nutritional status regarding the vitamin B2, as FAD proceeds from riboflavin intake. E-GR normally exhibits physiological partial saturation with its coenzyme. **OBJECTIVE:** To study the maximum *in vivo* saturation which could be reached by increasingly oral vitamin supplementation. **METHODS:** Three groups of normal volunteers were given 3 mg ( group A ), 20 mg ( group B ) and 50 mg ( group C ) riboflavin daily during twenty days. The enzyme activities were assayed before and after supplementation, with and without coenzyme addition to the reagent system. **RESULTS:** 77%, 83% and 87% saturation were observed in the groups A, B and C respectively. **CONCLUSION:** Increasing *in vivo* saturation was observed with increasing oral doses of riboflavin supplementation, but total saturation was not observed even with the highest oral 50 mg riboflavin supplementaion.

**KEY WORDS.** red cell glutathione reductase, riboflavin, vitamin B2.

**Address for correspondence:**

<sup>1</sup> Seção de Hematologia- Divisão de Patologia- Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.  
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César São Paulo/SP - Brasil - CEP 01246-902  
Tel.: (+55 11) 3068-2873 - Fax (+55 11) 3085-3505  
e-mail: maoshiro@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brazil.

<sup>3</sup> LIM 23 - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

## INTRODUCTION

There are red cell enzymes which are vitamin dependent, and so their activities are correlated with the specific vitamin nutritional condition<sup>2</sup>. As an example, glutathione reductase needs the coenzyme flavin adenine dinucleotide for accomplish with its catalytic function, which in turn requires riboflavin (vitamin B2) for its biosynthesis<sup>7</sup>. The red cell glutathione activity assay with or without FAD in the reagent system may be useful in affording the riboflavin physiological saturation. When adding FAD to the reagent system it saturates completely the enzyme loci for FAD, reaching maximum activity. Thus, a high increase of GR basal activity obtained when FAD is added to the reagent system indicates that the GR is deprived of sufficient vitamin B2 intake. Conversely, a slight activity increase obtained with FAD means a fairly good vitamin B2 nutritional status. This correlation is linear and may be used to evaluate the vitamin intake<sup>10</sup>.

An index has been proposed for measuring the nutritional vitamin status for all vitamin dependent enzymes, the activity coefficient (AC), which is the ratio of the activity after coenzyme addition/activity before coenzyme addition. Several studies have reported minimum AC normal threshold values for glutathione reductase of 1.2,<sup>5,13</sup> 1.3,<sup>9,12</sup> 1.4,<sup>11</sup> 1.5,<sup>1</sup> and values above these figures indicate vitamin deficiency.

As the enzyme coenzyme saturation is always partial in individuals with current normal diet<sup>3</sup>, the daily vitamin supplementation for a long period could lead to total coenzyme saturation.

In order to investigate which would be the vitamin B2 daily dosis for reaching an hypothetical total saturation, increasing oral supplementation riboflavin doses were given to normal volunteers.

## METHODS

Normal volunteers, from 24 to 54 years old, of both sexes, non smokers, not taking any medicine or vitamin supplementation were separated in the following groups:

### Group A:

15 individuals were given 3 mg riboflavin daily / 20 days

### Group B:

15 individuals were given 20 mg riboflavin daily / 20 days

### Group C:

18 individuals were given 50 mg riboflavin daily / 20 days

10 ml of blood were drawn and collected in EDTA, kept at 4° C for up to 2 days. The samples were washed in saline at 4° C for 4 times, and lysed in deionized water and freeze-and-thawing in acetone/dry ice bath. The suspension was centrifuged at 10,000 g and the supernatant was used for enzymatic assays.

The red cell glutathione reductase activity assays, with and without FAD, were done according to Beutler<sup>4</sup>, and were performed just before and just after treatment. The activity

coefficient (AC) is calculated as the ratio of the enzyme activity after coenzyme addition / activity before coenzyme addition.

Glutathione reductase saturation with its coenzyme was ascertained by the ratio enzyme activity before in vitro coenzyme addition / enzyme activity after in vitro coenzyme addition in the reagent system x 100.

Mann-Whitney statistical method for non-parametric data was employed with 5% of significance.

## RESULTS

Tables 1, 2 and 3 depict mean glutathione reductase activity values before and after treatment. It can be observed that there is a significant GR activity increase without FAD in the reagent systems, after 20 days treatment in all groups .

On the other hand, when FAD was added to the reagent systems in samples from riboflavin supplemented individuals, no significant activity increase (  $p > 0.05$  ) was observed.

In all groups a significant saturation increase after treatment (  $p < 0.05$  ) was observed. The highest observed saturation was 87% (AC: 1.15), obtained with 50mg riboflavin intake (Table 3).

## DISCUSSION

The GR activity increase without addition FAD in the reagent systems after treatment with riboflavin in all groups of this work has been also reported by other authors<sup>2, 3, 6, 8</sup>.

However, when FAD was added in the reagent system from riboflavin supplemented individuals samples, it was not observed significant GR activity increase , what suggests the physiological saturation was enhanced by the vitamin intake.

Increasing *in vivo* saturation was observed with increasing oral doses of riboflavin supplementation (Figure 1), but total saturation was not observed even with the highest oral 50 mg riboflavin supplementation. What would limit this saturation might be the slow riboflavin input into the red cells, or the existence of an absorption and or a metabolism regulatory mechanism.

It is interesting that glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient, it does not matter their nutrition condition, present 95%<sup>6,14</sup> saturation. In these individuals there is high red cell FAD concentration but low serum level, and this deficiency could increase the red cell FAD concentration and facilitate the FAD linkage with glutathione reductase<sup>6,11,14</sup>. Cirrhosis and severe uremia patients present 90%<sup>14</sup> saturation, and although presenting higher red cell FAD concentration, exhibit high serum FAD level<sup>14</sup>.

The data herein presented and together with some reported findings suggest there are factors which avoid that all apoenzymes linking sites may be saturated with FAD.

It is known that red cells remain in circulation for 120 days, and after many metabolic and membrane changes, mostly by oxidative damage, they are deeply affected and are trapped by spleen. It is possible that even red cell ageing may affect the receptors for riboflavin or FAD

As the individuals in this study were given vitamin supplementation for 20 days with high vitamin doses, it is feasible to suggest that riboflavin was preferably used by young and mature red cells, which present functioning metabolic pathways. On the other hand, the senescent erythrocytes which exhibit the referred changes, hardly accomplish with the metabolic needs and would jeopardize the riboflavin utilization. The lack of maximum saturation, of about 13%, could be ascribed

to the percentage of old cells, which comprise those cells older than 105 days, which are not capable to absorb riboflavin and or to convert riboflavin to FAD.

Another approach would to supplement volunteers for 120 days, what would afford constant riboflavin availability for all red cells produced during this period, so that all young cells could be saturated by riboflavin and keep its coenzyme throughout their life span, reaching FAD total saturation in all cells.

**Table 1.** Group A. Mean glutathione reductase activity (IU.g Hb-1. min<sup>-1</sup> a 37°C), without and with FAD addition to the reagent system, and Activity Coefficients (AC). 15 individuals with 3 mg riboflavin daily supplementation for 20 days

	Without FAD	With FAD	AC	% saturation
Before treatment	7.36 ± 0.6	11.0 ± 0.9	1.5 ± 0.1	66.4 ± 6.2
After treatment	8.5 ± 0.6	11.1 ± 0.9	1.3 ± 0.1	77.3 ± 5.7
<i>P</i>	<0.0001	0.1909	<0.0001	<0.0001

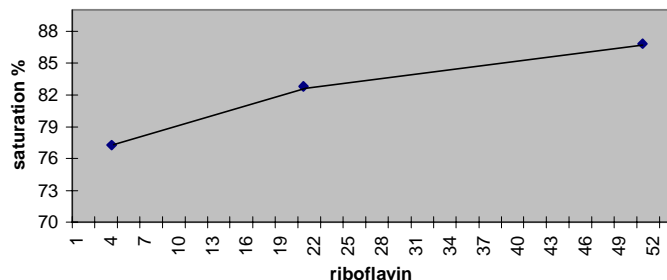
**Table 2.** Group B. Mean glutathione reductase activity (IU.g Hb-1. min<sup>-1</sup> at 37°C), without and with FAD addition to the reagent system, and Activity Coefficients (AC). 15 individuals with 20 mg riboflavin daily supplementation for 20 days

	Without FAD	With FAD	AC	% saturation
Before treatment	7.2 ± 0.7	10.7 ± 0.9	1.5 ± 0.1	68.1 ± 6.2
After treatment	8.8 ± 0.5	10.7 ± 0.9	1.2 ± 0.1	82.8 ± 6.4
<i>P</i>	0.0001	1.0000	0.0001	0.0001

**Table 3.** Group C. Mean glutathione reductase activity (IU.g Hb-1. min<sup>-1</sup> at 37°C), without and with FAD addition to the reagent system, and Activity Coefficients (AC). 18 individuals with 50 mg riboflavin daily supplementation for 20 days

	Without FAD	With FAD	AC	% saturation
Before treatment	7.6 ± 0.8	10.2 ± 1.0	1.4 ± 0.1	74.4 ± 6.8
After treatment	9.0 ± 1.1	10.3 ± 1.1	1.1 ± 0.1	86.8 ± 3.4
<i>P</i>	<0.0001	0.3529	<0.0001	<0.0001





**Figure 1** - Percentage of glutathione reductase saturation achieved by increasing riboflavin supplementation

#### Acknowledgement

We are indebted to the Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas da FMUSP for having supplied the riboflavin preparations for this study.

RIALA6/944

Oshiro, M. et al. - Saturação da glutatona redutase eritrocitária obtida pela saturação oral com riboflavina.  
*Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(2): 91 - 94,2003.

**RESUMO.** A atividade da glutatona redutase eritrocitária (GR-E) é dependente da coenzima flavina adenina dinucleotídeo (FAD), derivada da vitamina B2. Em condições nutricionais normais a saturação desta enzima por esta coenzima é parcial. **OBJETIVO:** Estudar se *in vivo* a máxima saturação da GR-E pode ser observada através da administração oral crescente de riboflavina. **MATERIAL E MÉTODOS:** Voluntários normais com idade entre 24 e 54 anos ingeriram por 20 dias consecutivos 3 mg (grupo A), 20 mg (grupo B) e 50 mg (grupo C) de riboflavina. A determinação da atividade enzimática foi realizada antes e após a ingestão da riboflavina, com e sem adição da coenzima no sistema reagente. **RESULTADOS:** Foram observadas saturações de 77%, 83% e de 87% nos grupos A, B e C respectivamente. **CONCLUSÃO:** O aumento crescente da saturação *in vivo* foi observado à medida que a dose de suplementação foi sendo aumentada. A saturação total “*in vivo*” não foi observada mesmo com a maior dose de 50 mg de riboflavina.

**PALAVRAS-CHAVE.** glutatona redutase eritrocitária, riboflavina, vitamina B2, glóbulo vermelho.

#### REFERENCES

1. Bayoumi RA, Rosalki SB. Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzyme for detection of deficiency of vitamins B1, B2 and B6. *Clin. Chem.*, 22(3):327-35, 1976.
2. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Clin. Invest.*, 48:1957-66, 1969.
3. Beutler E. Glutathione reductase: stimulation in normal subjects by riboflavin supplementation. *Science*, 165:613-5, 1969.
4. Beutler E. **Red cell metabolism – a manual of biochemical methods.** Grune & Stratton, Inc., 3<sup>o</sup> ed., 1984. p.72-73.
5. Fernández-bañares F, et al. Factors associated with low values of biochemical vitamin parameters in healthy subjects. *Internat. J Vit Nutr Res*, 63:68-74, 1993.
6. Flatz G. Enhanced bilding of FAD to glutathione reductase in G-6-PD deficiency. *Nature*, 226(23):755, 1970.
7. Garrett RH, Grisham CM. Coenzymes and Vitamins. In: **Biochemistry**, Flórida: Sauders College Publishing; 1995.cap.14.p.474-80.
8. Hoorn RKJ, Flikweert JP, Westerink D. Vitamin B1, B2 and B6 deficiencies in geriatric patients, measured by coenzyme stimulation of enzyme activities. *Clin Chim Acta*, 61:151-62, 1975.
9. Kuizon MD, Natera MG, Alberto SP et al. Riboflavin requirement of Filipino women. *Euro J Clin Nutr*, 46:257-64, 1992.
10. Mandula B, Beutler E. Synthesis of riboflavin nucleotides by mature human erythrocytes. *Blood*, 36(4):491-9, 1970.
11. Mccornick, DB. Riboflavin. In: Shilds ME, Olson JA, Shike M. **Modern nutrition in health and disease**, 8.ed., Philadelphia: Lea & Febiger; 1994.p.366-75.
12. Nichoalds GE. Assessment of status of riboflavin nutriture by assay of erythrocyte glutathione reductase activity. *Clin Chem*, 20(5):624-8, 1974.
13. Toh SY, Thompson GW, Basu TK. Riboflavin status of the elderly: ditary intake and FAD-stimulating effect on erythrocyte glutathione reductase coefficients. *Euro J Clin Nutr*, 48:654-9, 1994.
14. Yawata Y, Tanaka K. Regulatory mechanism of glutathione reductase activity in human red cells. *Blood*, 43:99-109, 1974.

Recebido em 04/11/2002 ; Aprovado em 15/05/2003

## Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2.

### Procedure for simultaneous determination of trichothecenes: deoxynivalenol and T-2 toxin.

Edilira BARAJ<sup>1</sup>  
Eliana BADIALE-FURLONG<sup>1\*</sup>

RIALA6/945

Baraj, E. ; Badiale-Furlong, E. - Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 95 - 104,2003.

**RESUMO.** Os tricotecenos são um grupo de micotoxinas sesquiterpenóides produzidas por várias espécies de fungos, como *Fusarium*, *Stachybotris*, *Trichothecium*, *Trichoderma* e *Myrothecium*. Estes tricotecenos são relativamente estáveis aos principais processos e dificilmente são removidos dos grãos contaminados sob condições moderadas. O desoxinivalenol (DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado. Outro é a toxina T-2, um tricoteceno do grupo A, freqüentemente encontrado em cereais, que tem sido bastante estudado por ser dez vezes mais tóxico que o DON. No presente trabalho, foi adaptado e avaliado um método para determinação simultânea da toxina T-2 e de DON por cromatografia de camada delgada (ccd). A matriz empregada para o desenvolvimento do procedimento foi o malte cervejeiro. Foram estudados sistemas de extração e purificação dos extrato, eluentes e agentes reveladores. Posteriormente o método foi aplicado em amostras de arroz e farinha de trigo. O limite de detecção do método foi de 40 ng/ mancha para toxina T-2 e 50 ng/ mancha para DON; a recuperação média foi de 77,9% e 80,5%, respectivamente para cada toxina. Foram detectadas contaminadas uma amostra de arroz branco com 266µg. Kg<sup>-1</sup> e duas de farinha de trigo com 128 e 323 µg. Kg<sup>-1</sup> de DON.

**PALAVRAS-CHAVE.** desoxinivalenol, toxina T-2, determinação de tricotecenos, ccd

\*Endereço para correspondência:

<sup>1</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande- Laboratório de Micotoxinas  
Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475  
96201-900 - Rio Grande, RS  
email: dqmebf@super.furg.br

## INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por vários gêneros de fungos, tais como *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon* e *Trichothecium*, de onde vem o nome da família de toxinas<sup>18</sup>. Espécies do gênero *Fusarium* são as que mais freqüentemente estão relacionadas com a ocorrência de tricotecenos em cereais e seus derivados, e podem contaminar a planta ou o grão no período pré e pós-colheita. Os tricotecenos podem ocasionar perda de apetite, vômito, diarreia e alterar as funções dos sistemas neurológico e imunológico<sup>18</sup>.

Quimicamente os tricotecenos são derivados de um sistema aromático, chamado tricotecano (Figura 1). Os que ocorrem na natureza contem uma ligação olefínica no C- 9,10 e também um anel epóxi em C-12,13, o que lhes confere a denominação de “12, 13 epoxitricotecanos”. Geralmente, os átomos de carbono em posições 3, 4, 7, 8, 14 e 15 são ocupados por hidrogênio, hidroxila, grupamentos acila, epóxido adicional ou ligações éster macrocíclicas. Em função dos substituintes são classificados em 4 grupos com diferentes propriedades físico-químicas e toxicidade. O desoxinivalenol (DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado em alimentos, pertencente ao grupo B. Outro é a toxina T-2, um tricoteceno do grupo A, freqüentemente encontrado em cereais, que tem sido amplamente estudado por ser dez vezes mais tóxica que o DON<sup>2, 16</sup>.

Desde que os tricotecenos foram reconhecidos como contaminantes importantes no meio ambiente e dos alimentos, foram propostos diferentes métodos para a análise destes compostos. Como ocorre com outras micotoxinas os métodos cromatográficos são importantes para identificação e quantificação dos diferentes tricotecenos da família. Devido a falta de cromóforo na estrutura os métodos espectroscópicos, especificamente os colorimétricos e fluorimétricos não podem ser usados diretamente para determinação quali ou quantitativa deles, tornando-se necessário o uso de reagentes de derivação<sup>12, 17</sup>.

Na literatura se encontram várias técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência, de camada delgada e gasosa combinando procedimentos de derivação química para desenvolvimento de propriedades cromóforas ou para aumentar a volatilidade para a detecção e quantificação de tricotecenos<sup>10, 12, 16, 17</sup>.

As técnicas que empregam cromatografia de camada delgada são as mais simples, e se operadas cuidadosamente apresentam boa performance e permitem a determinação destas toxinas de maneira acessível para laboratórios com diferentes tipos de infraestrutura<sup>11, 24</sup>, o que também vem sendo incentivado pela FAO e FDA. No caso dos tricotecenos a determinação simultânea de compostos de diferentes grupos é um desafio para analistas, pois as diferenças estruturais requerem combinações de solventes extratores e reagentes derivadores

muito cuidadosas para evitar prejudicar a recuperação das toxinas dos diferentes grupos<sup>6, 16, 18</sup>.

A proposta deste trabalho foi disponibilizar um procedimento simples para a determinação simultânea de tricotecenos, desoxinivalenol e toxina T-2, respectivamente dos grupos A e B, empregando cromatografia de camada delgada. Para tal foram combinados procedimentos de extração e limpeza anteriormente empregados na determinação isolada e simultânea de tricotecenos tipo A e B, descritos por Scott<sup>17</sup> para determinação de tricotecenos em cromatografia gasosa; por Sabino<sup>14</sup> para determinação de desoxinivalenol; por Marochi et al.<sup>11</sup> para determinação de toxina T-2 e macrocíclicos, e Furlong et al.<sup>6</sup>, para determinação de tricotecenos do grupo A e B por cromatografia gasosa.

Para efetuar a adaptação do procedimento foram escolhidos amostras de malte provenientes de diferentes lotes cedidos por empresas importadoras, situadas na cidade de Rio Grande, RS. Posteriormente o procedimento desenvolvido foi aplicado em amostras de farinha de trigo e arroz integral, parboilizado e branco<sup>4, 12</sup>.

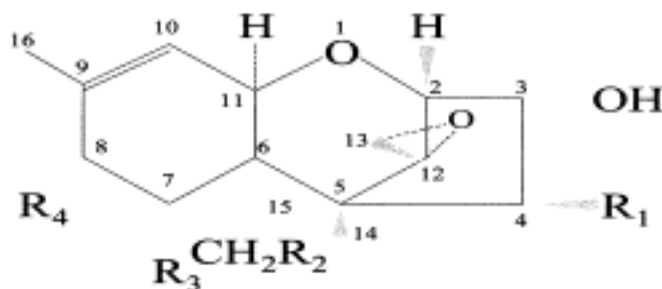


Figura 1: Estrutura geral dos tricotecenos

## MATERIALE MÉTODOS

### 1. Reagentes:

- Carvão ativo granulado: tamanho de partícula 1-2 mm marca Labsynth Brasil
- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> activ. 0,063-0,200 mm marca Merck.
- Celite comercial, pré-lavada com HCl, segundo a AOAC (1995)
- Sílicagel G60: tamanho de partícula 5-40 µm.
- Outros reagentes grau P.A.

### 2. Padrões

Os padrões de desoxinivalenol (DON) e toxina T-2 foram adquiridos da Sigma Chemical Company E.U.A.

As soluções estoques dos padrões foram preparadas dissolvendo-os em benzeno:acetonitrila (98:2), sendo a concentração de toxina T-2 20 µg . mL<sup>-1</sup> e de DON 50 µg . mL<sup>-1</sup>. A partir destas soluções foram preparadas soluções diluídas de trabalho. Todas foram armazenadas em frasco âmbar a temperatura - 5°C. Para avaliar as concentrações dos padrões foi empregado o método descrito por Bennett e Shotwell<sup>2</sup>, empregando a absorvidade molar das toxinas em benzeno.

### 3. Amostras empregadas na padronização da metodologia

As amostras de malte foram cedidas por indústria importadora localizada na cidade de Rio Grande, RS. Foram tomadas alíquotas de 4 lotes provenientes de diferentes países e levadas ao laboratório. Estas foram misturadas e moídas em moinho tipo de facas marca Tecnal. O material moído foi peneirado em vibrador por 1 hora, e a porção correspondente a granulometria de 60 mesh foi separada para ser empregada nos procedimentos para adaptação de metodologia.

### 4. Escolha do sistema solvente para eluição e separação dos tricotecenos e do agente revelador

Em placas cromatográficas comerciais e preparadas no laboratório, com e sem tratamento prévio com solução de cloreto de alumínio 15% em metanol, foram aplicadas alíquotas de 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 ng de solução padrão de DON e 40, 60, 100, 200 e 400 ng de toxina T-2.

Estas foram desenvolvidas em 5 sistemas solventes, sendo: tolueno- acetato de etila (1:3); clorofórmio - metanol (93:7); tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (5:4:1); clorofórmio - acetona - isopropanol (8:1:1) e tolueno - acetato de etila (2:3).

Após a eluição as placas foram submetidas a diferentes sistemas de revelação: cloreto de alumínio 15% em metanol 85%; ácido sulfúrico 20% em etanol 50% e ácido cromotrópico 10% com 5 partes de ácido sulfúrico 5 :3 em água.

Depois de borrifadas com os reveladores, as placas foram aquecidas em temperaturas 105°C por 10 minutos; 120°C por 10 minutos e 115°C por 7 minutos, respectivamente para cada

reagente revelador. As manchas de tricotecenos foram observadas sob luz ultravioleta em comprimento longo (354 nm)<sup>3,8,9,11,15,16,21,23</sup>. O critério utilizado para a escolha da condição cromatográfica a ser adotada foi o que resultou em menor limite de detecção de DON e toxina T-2 e separação das toxinas em relação a interferentes.

### 5. Escolha do procedimento de extração dos tricotecenos das amostras.

As amostras do malte para serem empregadas nesta etapa foram contaminadas artificialmente com 400 ng/g com DON e toxina T-2.

O primeiro procedimento testado para extração dos tricotecenos das amostras foi o descrito por Scott<sup>17</sup>, desenvolvido para determinação de nivalenol, desoxinivalenol, toxina T-2, toxina HT-2 e diacetoxiscirpenol em amostras de farinha de trigo e milho.

O outro procedimento testado foi descrito por Soares<sup>19</sup> para determinação de aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina e zearalenona em milho, feijão, mandioca, amendoim e arroz e posteriormente adaptado por Furlong et al<sup>6</sup> para determinação de tricotecenos em grãos de trigo.

Para avaliar o efeito dos diferentes agentes clarificantes e solventes de partição na extração de tricotecenos, foi empregado o método de análise fatorial, através de uma matriz de planejamento fatorial 3<sup>2</sup> (tabela 1).

**Tabela 1.** Planejamento fatorial 3<sup>2</sup> para o uso de solventes e clarificantes diferentes na extração de amostras de malte.

<i>Experimento</i>	<i>Clarificante</i>	<i>Solvente de partição</i>
1	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CHCl <sub>3</sub>
2	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +carvão ativo	CHCl <sub>3</sub>
3	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +CuCO <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>
4	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CHCl <sub>3</sub> +CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
5	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +carvão ativo	CHCl <sub>3</sub> + CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
6	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CuCO <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> + CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
7	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
8	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +carvão ativo	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
9	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CuCO <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

Os diferentes extratos foram purificados em minicolunas de carvão ativo/alumina/celite (0,7:0,5:0,3), eluídos com 4 porções de 5 mL do mesmo solvente de partição. O eluente foi seco em banho-maria à 30°C, quando usado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e à 40°C quando usado CHCl<sub>3</sub> ou CHCl<sub>3</sub>: acetato de etila, em todos os casos sob corrente de nitrogênio. Os extratos secos foram armazenados a -5°C e ressuspensos com 200µL de benzeno no momento de realização da cromatografia.

Foi utilizada uma escala de 1 a 9 para determinação da intensidade das manchas de interferentes nas placas, sendo a amostra mais limpa a de pontuação menor. As placas foram observadas antes e depois de revelação com ácido sulfúrico 20% em etanol 50% sob luz ultravioleta longo, sendo avaliadas e pontuadas por três avaliadores treinados.

#### 6. Recuperação de DON e toxina T-2

Considerando os dados de literatura<sup>1,9,14,16</sup> que indicam vários níveis de contaminação com estas toxinas, foi preparada uma série de amostras de malte contaminadas artificialmente, com alíquotas de padrões de DON e toxina T-2 em seis níveis diferentes (200, 350, 500, 650, 800 e 1000 ng/g). Para avaliação dos teores recuperados, foram realizadas comparações de fluorescência das manchas de amostras com padrões aplicados em placas de sílicagel com e sem prévia preparação com cloreto de alumínio, visualizadas sob luz ultravioleta longa, após a revelação.

A confirmação foi realizada empregando o método de acetilação com anidrido acético – piridina, descrito por Stahr et al<sup>20</sup>.

#### 7. Aplicabilidade do método proposto a outros tipos de amostras.

Após o estabelecimento do procedimento de preparo, extração, clarificação e separação dos tricotecenos DON e toxina T-2 este foi aplicado a amostras de farinha de trigo, arroz branco, parboilizado e integral. Nestas foram testados os limites de quantificação, recuperação e realizados levantamentos de ocorrência em amostras adquiridas no comércio local.

Três marcas de farinha de trigo, disponíveis no comércio da cidade de Rio Grande, RS, foram coletadas nos anos de 2000

a 2002 em diferentes estações do ano. A coleta delas seguiu um protocolo que consistiu em tomar 1% dos pacotes de 1 Kg disponível nas gôndolas, de diferentes estabelecimentos comerciais, para comporem a amostra bruta. Destes 1% foram tomadas e homogeneizadas para constituindo as amostras de laboratório de onde foram tomadas as alíquotas analíticas. Foram avaliadas 112 amostras de farinha<sup>5</sup>.

O mesmo procedimento de amostragem foi realizado para três marcas de arroz branco, parboilizado e integral, levando em consideração a safra ao qual pertencia o produto comercializado. Foram analisadas 36 amostras de arroz branco, 18 parboilizado e 9 integral. Antes da determinação os grãos foram moídos em moinho de facas até a granulometria de 60 mesh<sup>12</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Escolha do eluente e do agente revelador

Avaliando os cinco sistemas solventes experimentados para separar o DON e a toxina T-2 observou-se os melhores resultados ocorriam quando foram empregados: tolueno - acetato de etila (2:3) e tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (5:4:1), como já haviam mencionado Marochi et al<sup>11</sup>.

Os outros sistemas testados não se mostraram eficientes. Os resultados dos limites de detecção determinados nos diferentes eluentes e agentes reveladores e os respectivos Rf aparecem especificados na tabela 2.

Pode-se observar que houveram duas condições que apresentaram as melhores respostas: usando a placa embebida em solução de cloreto de alumínio 15% empregando como eluente uma mistura de tolueno - acetato de etila (2:3), revelada posteriormente com ácido cromotrópico para determinação de toxina T-2 e o outro usando placa de sílicagel desenvolvida num sistema solvente tolueno - acetato de etila - ácido fórmico revelada com solução de ácido sulfúrico 20% em etanol 50%. Cabe salientar que esta segunda opção apresenta um custo mais baixo e que o ponto crítico é a relação tempo / temperatura durante a revelação.

**Tabela 2.** Sistemas solventes e agentes reveladores para determinação simultânea de DON e toxina T-2 por CCD e seus limites de detecção.

Tricoteceno	Revelador	Sistema solvente <sup>2</sup>	Luz UV (365nm)		Luz Visível		R <sub>f</sub>	
			Ld (ng/mancha)	Cor	Ld (ng/mancha)	Cor		
DON	AlCl <sub>3</sub>	1	150	Azul	ND		0,19	
		2	100	Azul	ND		0,15	
		3	100	Azul	ND		0,13	
		4	50	Azul	ND		0,12	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	50	Marrom-	50	Marrom	0,29	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	100	amarelado	150	Marrom	0,90	
				Marrom claro				
T-2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (em placa de AlCl <sub>3</sub> )	1	100	Verde	ND		1	
		2	ND		ND			
		4	100	Verde	ND		0,45	
			3	40	Verde-azulado	100	Cinza	0,54
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	100	Verde-azulado	ND		0,60	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	40	Verde	100	Púrpura	0,45	
	Ác.Cromotrópico (em placa de AlCl <sub>3</sub> )	3	60		ND		0,55	
	Ác.Cromotrópico			Púrpura				

Ld: limite de detecção \* 1. Tolueno-acetato de etila (1:3); 2. CHCl<sub>3</sub>:metanol (93:7); 3. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1); 4. Tolueno:acetato de etila (2:3); 5. CHCl<sub>3</sub>:acetona:isopropanol (8:1:1). ND- não detectado

## 2. Escolha do clarificante e solvente de partição.

Conforme mencionado, primeiramente foram comparados os procedimentos de Scott<sup>17</sup> e de Soares<sup>19</sup> para a extração, pois são procedimentos simples, com poucas etapas e que empregam pequenas quantidades de solventes. No caso do primeiro, que já havia sido empregado para determinação simultânea dos tricotecenos do grupo A e B, algumas dificuldades foram observadas tais como: formação de emulsão, evaporação demorada na etapa final, formação de gel na etapa de minicolunas, dificuldade de ressuspensão dos extratos, o que descartou o seu emprego.

Durante a aplicação do procedimento de Soares<sup>19</sup> para extração de tricotecenos das amostras de malte, foi observado que os extratos apresentavam compostos que interferiam na determinação de DON e toxina T-2 por cromatografia de camada delgada. Alguns interferentes ocorriam na altura do R<sub>f</sub> da última toxina o que foi solucionado desengordurando previamente as amostras com hexano.

Seguindo a matriz de planejamento (tabela 1) os extratos foram ressuspensos em 200 µL de benzeno, 20 µL foram aplicados em placa de silicagel e desenvolvidas em tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1). Os resultados da avaliação da limpeza das placas pelos diferentes avaliadores antes e depois da revelação aparecem respectivamente nas tabelas 3 e 4 para placas preparadas no laboratório e comerciais.

A observação dos resultados descritos na tabela indica que as melhores condições nestas duas etapas são o uso de clorofórmio ou cloreto de metileno como solvente de partição e de sistema celite-sulfato de amônio como agente clarificante. O mesmo sistema também foi empregado por Furlong et al<sup>6</sup>. Ao contrário de Marochi et al<sup>11</sup> também neste caso o carbonato de cobre não acarretou melhora na limpeza das placas e por isso não foi utilizado. O cloreto de metileno foi escolhido por sua maior volatilidade que facilita nesta etapa do trabalho.

**Tabela 3.** Pontuação da intensidade dos interferentes nas amostras de malte antes da revelação ( média em dois tipos de placas)

Experimento	Placa 1 *	Placa 2 *	Média **
1	4,00	3,67	3,84
2	5,00	5,00	5,00
3	6,33	4,33	5,33
4	5,33	4,33	4,83
5	6,33	5,00	5,67
6	7,33	6,67	7,00
7	1,33	1,33	1,33
8	2,67	3,00	2,84
9	1,33	1,33	1,33

Placa 1: preparada com sílicagel G-60  
\* média de três avaliadores

Placa 2: placa pronta Wathman 0,25 mm  
\*\* média da pontuação das duas placas

**Tabela 4.** Pontuação da intensidade dos interferentes depois da revelação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (média em dois tipos de placas)

Experimento	Placa 1 *	Placa 2 *	Média**
1	1,33	2,33	1,73
2	4,33	4,67	4,50
3	4,33	4,33	4,33
4	6,33	6,67	6,50
5	7,00	7,00	7,00
6	6,67	7,67	7,17
7	2,33	2,33	2,33
8	4,67	5,33	5,00
9	2,33	3,67	3,00

Placa 1: preparada com sílicagel G-60  
\* média de três avaliadores

Placa 2: placa pronta Wathman 0,25 mm  
\*\* média da pontuação das duas placas

3. Procedimento Proposto para determinação simultânea de DON e toxina T-2 no malte.

O procedimento que melhor se prestou para determinação simultânea de DON e toxina T-2 nas amostras do malte cervejeiro foi o procedimento de Soares com as modificações mencionadas. Todas as etapas estão apresentadas em seguir:

1) Extrair 50 g de amostra do malte desengordurado com 300 mL de mistura metanol-KCl 4% (9:1) em blender com velocidade média por 3 minutos.

2) Filtrar em papel de filtro sanfonado. Transferir uma alíquota de 150 mL de filtrado para um bequer contendo 150 mL de solução de sulfato de amônia 30% e 50 cm<sup>3</sup> de celite pré-lavada com ácido. Homogeneizar com bastão de vidro e deixar em repouso por mais de 5 minutos.

3) Filtrar novamente em papel de filtro sanfonado. Transferir 150 mL deste segundo filtrado para um funil de separação contendo 150 mL de água destilada. Adicionar 10 mL de cloreto de metileno (ou clorofórmio).

4) Efetuar a partição agitando lentamente por 3 minutos. Deixar em repouso por mais 10 minutos para separar as camadas. Recolher a fase orgânica num bequer. Retirar uma alíquota de 5 mL (amostra para quantificação) e passá-la por uma minicoluna de carvão ativo-alumina-celite (0,7:0,5:0,3). Receber o eluato num frasco. Guardar o resto da solução do bequer (amostra para triagem) num segundo frasco.

5) Repetir a partição com mais 10 mL de cloreto de metileno (ou clorofórmio). Recolher a fase orgânica no outro bequer. Retirar de novo 5 mL e passar por minicoluna.

6) Eluir a minicoluna com 4x5 mL de solvente de partição, juntando todas as porções no primeiro frasco.

7) Evaporar o cloreto de metileno em banho-maria à 30°C (ou cloroformio à 40°C) sob corrente de nitrogênio. Guardar o extrato seco no frasco fechado a temperatura -5°C.

8) Ressuspender o extrato com 200µL de benzeno e agitar em banho ultra-sônico. Este extrato está pronto para aplicação em placas cromatográficas.

9) Aplicar na placa de silicagel (simples ou embebida em solução de AlCl<sub>3</sub> 15% em metanol 85%) 10 µL do extrato final da amostra e quantidades de padrões de DON e toxina T-2, correspondente a possível contaminação de amostra.

10) Desenvolver a placa simples no sistema solvente tolueno:acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1) e a placa embebida em AlCl<sub>3</sub> em sistema solvente tolueno:acetato de etila (2:3).

11) Secar a placa à temperatura ambiente dentro da capela.

12) Revelar a primeira placa com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% em etanol 50% e aquecer à 120°C por 10 minutos. Observar sob luz UV, comprimento de onda longo, as manchas marrom de DON aproximadamente em R<sub>f</sub> ≈ 0,29 e as manchas fluorescentes esverdeadas da toxina T-2 aproximadamente em R<sub>f</sub> ≈ 0,54. Sob luz visível as manchas da toxina T-2 aparecem de cor cinza.

13) Aquecer a placa embebida em AlCl<sub>3</sub> por 10 minutos à 105°C. Observar sob luz UV as manchas fluorescentes azuis de DON em R<sub>f</sub> ≈ 0,12 aproximadamente. Revelar a região da toxina T-2 com ácido cromotrópico e aquecer à 120°C por 7 minutos. Observar as manchas fluorescentes verdes desta toxina sob luz UV, comprimento de onda longo em R<sub>f</sub> ≈ 0,45.

**Tabela 5.** Resultados de testes de recuperação de DON e T-2 em seis níveis de contaminação de amostras de malte desengordurado.

	Contaminação (ng/g)	% recuperação DON	% recuperação toxina T-2
1	200	40,8	81,6
1	200	40,8	81,6
2	350	69,9	93,9
2	350	70,0	93,3
3	500	81,6	65,3
3	500	65,3	65,3
4	650	87,9	67,6
4	650	87,9	67,8
5	800	81,6	75,5
5	800	81,6	75,5
6	1000	97,9	83,4
6	1000	89,8	89,8
6	1000	97,9	80,0
6	1000	73,5	88,2

#### 4. Recuperação de tricotecenos das amostras do malte

As amostras do malte moído, desengordurado e não contaminado, foram fortificadas com padrões de DON e toxina T-2 em seis níveis diferentes (200, 350, 500, 650, 800 e 1000 ng/g). Foi empregado o procedimento estabelecido para a extração dos tricotecenos e os padrões foram aplicados nas placas nas concentrações mencionadas em material e métodos (item 6).

Os resultados de recuperação dos tricotecenos DON e toxina T-2 em todos os níveis estudados, aparecem na tabela 5, onde estão os resultados das aplicações feitas nas placas pré-prontas de silicagel ou nas placas de silicagel embebidas em solução de AlCl<sub>3</sub> 15% em metanol, respectivamente.

Pode-se observar pela tabela 5 e considerar que houve uma boa recuperação das duas toxinas, sendo que para os níveis de contaminação mais baixos, a toxina T-2 foi melhor recuperada, enquanto que para os níveis mais altos, foi o DON que mostrou valores mais altos de recuperação.

Os valores médios de recuperação foram 80,55% para o DON e 77,94 para a toxina T-2. Cabe salientar que para a estimativa do valor médio da recuperação de DON não foi considerado o nível de contaminação 200 ng/g, que foi 41%.

O maior nível de contaminação foi utilizado para estimar a repetibilidade do procedimento, tendo um coeficiente de variação de 7,3% e 7,2% respectivamente para DON e toxina T-2. Esta estimativa realizada nos diferentes níveis de contaminação estudados resulta em coeficientes de variação para DON de 23,6% e de 12,3% para toxina T-2

Alguns fatores podem influenciar nestes resultados. Primeiro, provavelmente as toxinas competem entre si pelos solventes de extração e separação. Um maior número de partições poderia realizar uma recuperação maior.

Outro fator pode ser a minicoluna utilizada para limpeza do extrato. Foram utilizadas minicolunas de carvão ativo: alumina: celite (0,7:0,5:0,3), que são recomendadas por muitos autores para estas determinações<sup>10,13,15,24</sup>. Mas, segundo um estudo de Galvano et al<sup>7</sup>, com 19 tipos de carvão ativo, foi observado que a capacidade deles para adsorção do DON varia de 1,83% a 98,93%. Os tipos utilizados pelo autor e colaboradores não foram Darco G-60, que é o carvão utilizado para preparação das minicolunas de limpeza neste caso. Mesmo assim, é muito provável que o carvão ativo Darco G-60 adsorva uma quantidade do DON. Este efeito é notável nos níveis baixos de contaminação. Seria interessante utilizar outro tipo de coluna de limpeza, principalmente para determinações quantitativas nos níveis menores que 300 ng/g.

O terceiro fator que pode causar este grau de recuperação, principalmente para o DON, é o tipo do solvente utilizado para ressuspender o resíduo. Tanaka et al<sup>22</sup> mostraram que a melhor recuperação do DON e NIV das amostras artificialmente contaminadas do arroz, foi obtida usando o metanol como solvente de ressuspensão do extrato seco, enquanto que a menor recuperação para o NIV obteve-se utilizando a mistura CHCl<sub>3</sub>/metanol (9:1). No nosso experimento foi utilizado o benzeno, o mesmo



**Tabela 6.** Determinação de tricotecenos do grupo A e B em arroz e farinha de trigo

Característica	Farinhas de Trigo	Arroz
Recuperação média de DON % (200 a 1000 ng/g)	90	77
Recuperação média de Toxina T-2 (200 a 1000 ng/g)	87	79
Repetibilidade DON, toxina T-2 (CV%)	17	11 e 10
Nº amostras analisadas	112	72
Falsos positivos	6(DON) 7(T-2)	2 (DON) 3 (T-2)
Amostras confirmadas	2 (DON)	1 (DON)
Níveis de contaminação $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$	323 e 128	266

## CONCLUSÃO

solvente de preparação dos padrões, por ele mostrar estabilidade maior no armazenamento das amostras. Por outro lado o benzeno ainda permite uma melhor aplicação nas placas cromatográficas, comparando com o metanol, o qual deixa uma mancha muito espalhada (Soares - comunicação pessoal).

### 5. Aplicabilidade do método a outros produtos alimentícios

O procedimento descrito foi checado quanto ao limite de quantificação, recuperação e repetibilidade em amostras de farinhas de trigo, de três marcas comerciais diferentes, coletadas em diferentes períodos nos anos de 2000 a 2002 e em amostras de arroz integral, parboilizado e branco coletados no ano 2000, no comércio da cidade de Rio Grande, RS.

Os resultados destas atividades aparecem na tabela 6.

Pode-se observar pela tabela que a performance do método não diferiu entre as matrizes em que foi aplicado. Cabe salientar que o número de amostras contaminadas por tricotecenos, desoxinivalenol e toxina T-2 foi relativamente pequeno e abaixo dos limites legislado por países da Comunidade Européia para estas toxinas<sup>26</sup>.

Foi proposto um procedimento para determinação simultânea de tricotecenos do grupo A e B, desoxinivalenol e toxina T-2, cujas melhores condições foram obtidas empregando como sistema extrator metanol - KCl (3:1), clarificante sulfato de amônio e limpeza em minicoluna de carvão ativo - celite e alumina. A fase estacionária foi a sílica-gel G 60, 0, 25 mm de espessura; eluentes foram o tolueno - acetato etila - ácido fórmico (5:4:1) e tolueno - acetato de etila (2:3). Os melhores agentes reveladores foram: ácido sulfúrico 20% em etanol 50% e cloreto de alumínio 15% em metanol 85% e ácido cromotrópico.

O limite de detecção para a toxina T-2 foi de 40 ng/mancha e para DON de 50 ng/mancha. A avaliação da recuperação média para os níveis de contaminação variando de 200 a 1000 ng/g foi de 80,5% e 77,9% respectivamente para malte.

O método aplicado a amostras de arroz e de farinha de trigo mostrou ter boa repetibilidade (CV 11 e 17%) e recuperação entre 90 e 77% respectivamente para DON e T-2, e um número baixo de falsos positivos (9,7%).

O DON foi o único tricoteceno detectado, aparecendo em 1,6% amostras, sendo duas de arroz e uma de farinha de trigo em níveis respectivamente de 128, 323 e 266 mg/Kg.

Baraj, E. ; Badiale-Furlong, E. - Procedure for simultaneous determination of tricothecenes: deoxynivalenol e T-2 toxin. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 95 - 104,2003.

**ABSTRACT.** The tricothecenes are a group of sesquiterpenoid mycotoxins produced by several general and species of fungi such as *Fusarium*, *Stachybotris*, *Trichothecium*, *Trichoderma* and *Myrothecium*. These tricothecenes are relatively stable during food processing and can be removed with difficulty from contaminated grains under moderate conditions. Among then deoxynivalenol (DON) is the most common contaminant of cereal grains, whilst the T-2 toxin, wich is frequently detected in foods, has been the most widely, because is 10 times more toxic then DON. In the present work it was adapted a methodology for simultaneous determination of DON and T-2 toxin by thin layer chromatography (TLC). The matrix chosen was barley malt. Extraction and purification systems, developing solvents and spray reagents used to visualize the tricothecenes have been compared. The method was employed to rice and wheat meals. The limits of detection of the method were 40 ng/spot for T-2 toxin and 50 ng/spot; with the average recoveries of 77,9 and 80,5% respectively. A rice sample was found contaminated with 266 µg. Kg<sup>-1</sup> and two samples of wheat meal with 128 e 323 µg. Kg<sup>-1</sup> DON.

**KEY WORDS.** deoxynivalenol, T-2 toxin, tricothecene determination, TLC

#### REFERÊNCIAS

1. Bata, A.; Ványi, A.; Lásztity, R. Rapid analytical method for the quantitative determination of tricothecene toxins in food and feeds. **Acta Veter. Hungar.**, 32 (1-2): 51-56, 1984.
2. Bennett, G. A.; Shotwell, O.L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73 (2): 270-5, 1990.
3. Betina, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **J. Chromatogr.**, 334: 211-276, 1985.
4. De Nijs, M.; et al. Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals grown in the Netherlands. **J. Food Prot.**, 59(7): 772-7, 1996.
5. Furlong, E.B.; et al. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Add. Contam.**, 12(5): 683-8, 1995.
6. Galvano, F.; et al. M. Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin a and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **J. Food Prot**, 61(4): 469-75, 1998
7. Gimeno, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem a. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 62(3): 579-85, 1979.
8. Kamimura H., et al. Y. Simultaneous detection of several *fusarium* mycotoxins in cereals, grains and foodstuffs. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(5): 630-3, 1981.
9. Langseth, W.; Rundberget, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic tricothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **J. Chromatogr. A**, 1.815: 103-21, 1998.
10. Marochi, M.A.; Soares, L.M.V.; Furlani, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricothecenos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(2): 17-20, 1996.
11. Nunes, I. L. **Micotoxinas, micoflora e seu potencial toxigênico em arroz destinado ao consumo humano.** Rio Grande, RS, 2001, 95p [Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, FURG]
12. Romer, T.R. Use of small charcoal/alumina columns in determination of tricothecenes mycotoxins in foods and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 69(4): 699-703, 1986.
13. Sabino, M.; et al. Determinação de deoxynivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 49 (2): 155-9, 1989.
14. Schaafsma, A.W.; et al.. Analysis of *fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. **Mycopathology**, 142: 107-13, 1998.
15. Scott, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of tricothecenes in grains and grains products. **J. Assoc. Off Anal. Chem**, 65(4): 876-882, 1982.
16. Scott, P. M. Determination of nivalenol, deoxynivalenol (vomitoxin), T-2 toxin, HT-2 toxin and diacetoxyscirpenol in cereals by gas chromatography with electron capture detection. In: **Laboratory Procedures Of Health Protection Branch Laboratories** – Bureau of Chemical Safety- Ottawa, August, 1986.
17. Scott, P.M. Tricothecenes in grains. **Cereal Food World**, 35(7): 661-6, 1990.
18. Soares, L. M. V. **Micotoxinas: um método para análise**

- simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas, São Paulo.** Campinas, SP, 1987.[Tese de Doutorado Universidade Estadual De Campinas, Faculdade De Engenharia De Alimentos].
20. Stahr, H.M.; *et al.*. Analysis of trichothecenes mycotoxins. **Appl. Spectrosc.**, 37(4): 396-400, 1983.
  21. Takeda, Y.; *et al.* Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 62(3): 573-77, 1979.
  22. Takitani, S.; Asabe, Y. Thin layer chromatographic analysis of trichothecenes mycotoxins. In: Y.Ueno **Trichothecenes: Chemical, Biological And Toxicological Aspects.** Kodasha.Ltda, Tokyo, Elsevier- Amsterdam, Oxford, New York,1983. IV p. 113-20.
  23. Tanaka, T.; *et al.* Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecenes mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. **Food Addit. Contam.**, 2(2): 125-7, 1985.
  24. Tapia, M.O. A Quantitative thin layer chromatography method for the analysis of aflatoxins, ochratoxin a, zearalenone, T-2 toxin and sterigmatocystin in foodstuffs. **Rev. Argent. Microbiol.**, 17(4): 183-6, 1985.
  25. Trucksess, M., W.; Nesheim, S.; Eppley, R.M. Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 67(1): 40-3, 1984.
  26. Fonseca, H. **Legislação Mundial para Micotoxinas.** [Http://www.micotoxinas.br](http://www.micotoxinas.br), outubro de 2002.

Recebido em 16/12/2002 ; Aprovado em 15/05/2003

## O uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs) nos acidentes ocorridos em um laboratório de saúde pública no período de maio de 1998 a maio de 2002

Individual and collective protection equipments (IPE and CPE) wearing in a health public laboratory accidents from may 1998 to may 2002

Marise SIMÕES<sup>1</sup>  
Eneida Gonçalves LEMES-MARQUES<sup>1</sup>  
Paulo Flávio Teixeira. CHIARINI<sup>1</sup>  
Maria de Fátima Costa PIRES<sup>2</sup>

RIALA6/946

Simões, M. et al. - O uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs) nos acidentes ocorridos em um laboratório de Saúde Pública no período de maio de 1998 a maio de 2002. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 105 - 109,2003.

**RESUMO.** A saúde dos trabalhadores tem merecido atenção do Sistema Nacional de Saúde e de organizações internacionais. Este estudo teve como objetivo avaliar os 38 acidentes registrados no período de maio de 1998 a maio de 2002 num laboratório de saúde pública, a relação com o não uso ou o uso inadequado de EPIs e EPCs pelos funcionários e a quantidade de horas trabalhadas pelos profissionais quando da ocorrência dos acidentes. Os dados foram obtidos nas fichas de registro de acidentes de trabalho elaboradas pelo grupo de biossegurança local e preenchidas durante entrevista com os acidentados. Os acidentes foram agrupados segundo a sua natureza, em cinco categorias: queimaduras (calor, frio, ácido); perfuro-cortantes; amostras biológicas; transporte de amostras; incêndios. Foram registrados 38 acidentes envolvendo 30 pessoas, sendo: 7 casos (18,42%) em 1998 (maio a dezembro); 10 (26,32%) em 1999; 7 (18,42%) em 2000; 7 (18,42%) em 2001 e 7 (18,42%) em 2002 (janeiro a maio). O acidente mais freqüente (37%) ocorreu com amostras biológicas, seguido pelos perfuro-cortantes (24%). Os EPIs estavam sendo utilizados de maneira incorreta ou incompleta em 22 dos acidentes relatados. Conclui-se, portanto, que é de fundamental importância a prevenção de acidentes frente a situações de risco em laboratório, e que a conscientização e responsabilidade na observação das normas de biossegurança envolve os profissionais em todos os níveis.

**PALAVRAS CHAVES.** biossegurança, laboratório, acidentes, EPIs, EPCs.

Endereço para correspondência:

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Campinas, Campinas, SP;

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central de São Paulo, São Paulo, SP.

## INTRODUÇÃO

A saúde dos trabalhadores, em relação às suas respectivas atividades profissionais, tem merecido uma atenção progressiva do Sistema Nacional de Saúde e de organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde, a Organização Internacional do Trabalho e as Comunidades Européias. Uva e Faria<sup>14</sup> descrevem risco profissional como a possibilidade de que um trabalhador sofra um dano provocado pelo seu trabalho, sendo este dano patologias ou lesões sofridas por ele em motivo deste trabalho ou durante o mesmo. Costa<sup>4</sup> define acidente como toda ação não programada, estranha ao andamento normal do trabalho, da qual poderá resultar dano físico ou econômico. Como as atividades nas instituições de saúde expõem o trabalhador a diversos agentes de risco, para a prevenção de possíveis acidentes advindos dessa exposição faz-se necessário estabelecer um programa que vise reduzir ou eliminar tais riscos. O primeiro passo para isso é a identificação de fatores de risco que possam causar estes acidentes e o estabelecimento de medidas que possam evitá-los, criando-se nos laboratórios um programa de prevenção de acidentes<sup>8</sup>.

O termo “contenção” é usado para descrever os métodos de segurança utilizados na manipulação de materiais infecciosos num ambiente laboratorial. O objetivo da contenção é reduzir ou eliminar a exposição da equipe do laboratório, de outras pessoas e do meio ambiente em geral, aos agentes potencialmente perigosos, capazes de causar riscos a saúde. Elementos de contenção incluem a prática e a técnica laboratorial, o equipamento de segurança e o projeto de instalação do laboratório. A avaliação do risco do trabalho a ser realizado com um agente específico determinará a combinação adequada destes três elementos. A rígida adesão às normas de práticas e procedimentos corretas, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e instalação de Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs) nos níveis de segurança adequados a cada laboratório, contribui para um ambiente de trabalho mais seguro e saudável para a equipe, seus colaboradores e a comunidade ao redor<sup>2</sup>. Todavia, os programas de biossegurança em laboratórios dependem principalmente da dedicação individual e atenção ao trabalho<sup>10</sup>. Ainda, o trabalho excessivo, executado de forma inadequada, pode levar ao desgaste físico e a acidentes. Para Almeida<sup>1</sup> a expressão “(con) fiabilidade humana” pode ser usada para indicar “a probabilidade de que um indivíduo, uma equipe, uma organização humana realize uma missão nas condições dadas, no interior de limites aceitáveis, durante um certo tempo”. Sperandio<sup>13</sup> sublinha a expressão “missão a cumprir” sob certos critérios e acrescenta: “a confiabilidade não é somente não cometer erros, é também fazer o gesto adequado, tomar a iniciativa que convém ao momento, recuperar um erro da máquina ou de outra operação”.

Os acidentes ocorridos, independentemente de sua dimensão, devem ser documentados e avaliados, visando à identificação das causas e possíveis correções<sup>4</sup>. Embora algumas causas de infecções acidentais tenham origem conhecida, apenas 20% das infecções adquiridas em laboratório obedecem a contatos, causas conhecidas e/ou detectáveis<sup>9</sup>. No entanto, a maior parte das infecções laboratoriais e dos acidentes de laboratório decorre

de erros humanos, da falta de técnica ou do uso inadequado dos equipamentos<sup>11</sup>. Deve-se, portanto, estimular programas que visem a melhoria contínua do trabalho levando-se em conta a sua qualidade não apenas para quem recebe o seu produto final, mas também para quem o realiza.

Todos os laboratórios devem ter disponíveis para uso os EPIs e EPCs recomendados para cada atividade específica, e os funcionários devem ser capacitados para o seu uso correto e para a realização adequada dos procedimentos técnicos necessários. No laboratório em estudo foi criada, em março de 1998, uma Comissão de Biossegurança que desde então vem trabalhando no sentido de conscientizar e orientar os funcionários a executarem suas atividades de forma segura.

Este estudo teve como objetivo avaliar os 38 acidentes registrados no período de maio de 1998 a maio de 2002, a sua relação com o não uso ou o uso inadequado de EPIs e EPCs pelos funcionários e a quantidade de horas trabalhadas pelos profissionais quando da ocorrência dos acidentes.

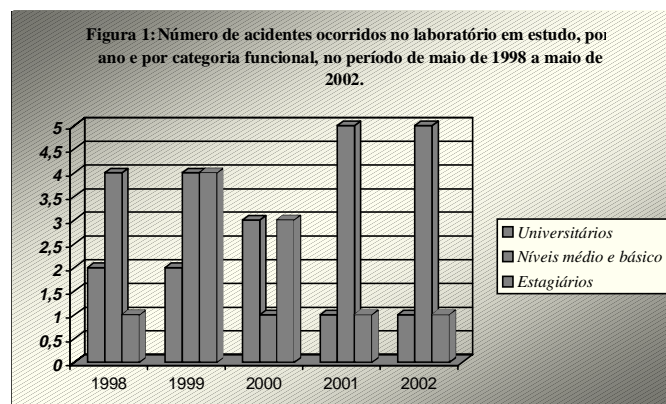
## CASUÍSTICA

No período estudado trabalhavam no laboratório 53 pessoas assim distribuídas: 33 funcionários, sendo 17 de nível universitário e 16 de nível médio e/ou básico; e 20 estagiários (nível universitário) que permaneciam por um ou dois anos. Os dados foram obtidos nas fichas de registro de acidentes de trabalho, elaboradas pelo grupo de biossegurança local e preenchidas durante entrevista com os acidentados. Os acidentes foram agrupados segundo a sua natureza em cinco categorias: queimaduras (calor, frio, ácido); perfuro-cortantes; amostras biológicas; transporte de amostras; incêndios.

## RESULTADOS

No período de quatro anos compreendido entre maio de 1998 a maio de 2002 foram registrados junto à Comissão de Biossegurança 38 acidentes envolvendo 30 pessoas, sendo: 7 casos (18,42%) em 1998 (maio a dezembro); 10 (26,32%) em 1999; 7 (18,42%) em 2000; 7 (18,42%) em 2001 e 7 (18,42%) em 2002 (janeiro a maio).

Na figura 1 observa-se a frequência dos acidentes por categoria funcional e por ano estudado.

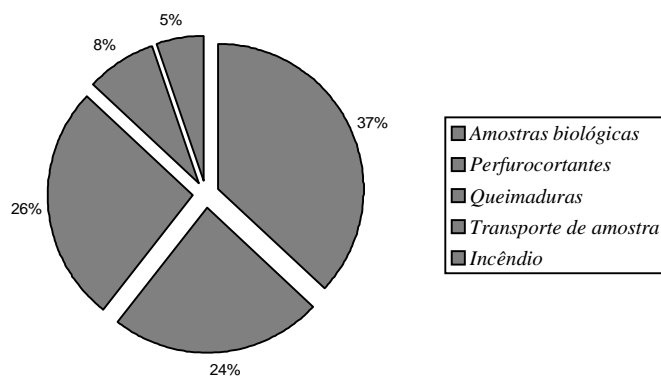


Dos 38 acidentes ocorridos, 9 (23,7%) foram com universitários (sendo que duas pessoas acidentaram-se duas vezes cada uma); 19 (50,0%) com funcionários de nível médio e/ou básico (sendo que uma pessoa acidentou-se três vezes e três pessoas acidentaram-se duas vezes) e 10 (26,3%) com estagiários (sendo que um deles acidentou-se duas vezes).

Com relação à natureza dos acidentes, os resultados estão na figura 2. Em oito casos houve necessidade de atendimento médico, seis deles do tipo perfuro-cortante, um por queimadura e um por incêndio, sendo que em quatro casos houve necessidade de afastamento temporário do trabalho.

A relação entre o uso incorreto e/ou a falta de uso de EPIs e EPCs durante os acidentes está na tabela 1.

**Figura 2. Porcentagem do número de acidentes ocorridos, agrupados segundo sua natureza.**



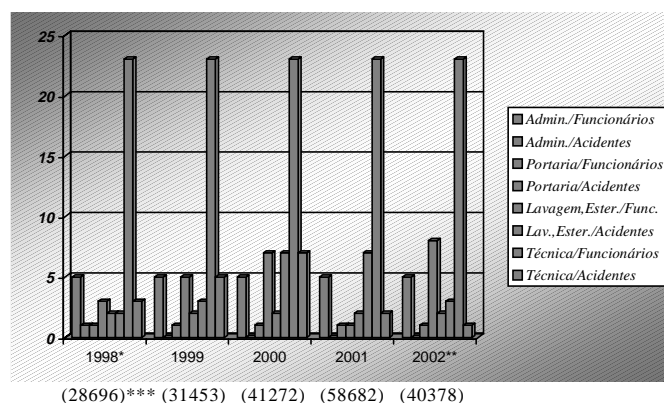
**Tabela 1. Relação entre uso correto / incorreto / falta de uso de EPIs e EPCs, com as categorias de acidentes acontecidos.**

EPIs/EPCs	USO			Total
	Sim	Incorreto	Não	
<b>Tipos de acidentes</b>	<b>correto</b>	<b>Incorreto</b>		
Amostra biológica	4	3	3	<b>10</b>
Péfuro-cortantes	3	0	6	<b>9</b>
Queimaduras	0	9	5	<b>14</b>
Transporte de amostra	0	2	1	<b>3</b>
Incêndio	0	1	1	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>38</b>

Os acidentes ocorreram nas seguintes áreas: administrativa (1); técnica (23); lavagem, esterilização e preparo de meios de cultura (7); recebimento de amostras (7). Na Figura 3, observa-se a relação entre o número de acidentes ocorridos nas diferentes áreas do laboratório, com o número de pessoas trabalhando em cada área e com o número de exames realizados por ano.

### DISCUSSÃO

Para Fayel<sup>6</sup> et al. nem sempre se dá a devida atenção aos riscos de transmissão de patógenos para profissionais da área de saúde, mas estes riscos são reais. Por outro lado, no laboratório estudado, devido ao grande número de acidentes ocorridos com estagiários em 1999, no ano de 2000 incluiu-se no programa de treinamento, um curso com as normas básicas de biossegurança. Foi planejado com os responsáveis de cada área a conscientização dos estagiários sobre os riscos inerentes à cada atividade e o uso correto dos EPIs e EPCs para as várias atividades.



**Nota:** \* Maio a Dezembro  
 \*\* Janeiro a Maio  
 \*\*\* Número de exames realizados por ano

**Figura 3: Relação entre o número de acidentes ocorridos nas diferentes áreas do laboratório, com o número de pessoas trabalhando em cada área e com o número de exames realizados, por ano.**

Para Moreira<sup>7</sup> et al., os acidentes com percutâneos são os mais frequentes e os com maior risco entre os acidentes com amostras biológicas. Neste estudo ocorreu o inverso, o acidente mais frequente (37%) foi com amostras biológicas, seguidas pelos perfuro-cortantes (24%).

Os EPIs estavam sendo utilizados, em 22 dos acidentes relatados, de maneira incorreta ou incompleta. Nos casos dos acidentes com amostras biológicas, as causas situaram-se em procedimentos técnicos realizados de maneira incorreta, aliados ao uso de EPIs e EPCs de forma incorreta, incompleta ou inadequada. A reciclagem da equipe de técnicos mostra-se necessária nestes casos para corrigir e evitar vícios adquiridos ao longo do tempo e criar uma conscientização com relação à “importância de cada um na segurança de todos”. Visando minimizar os riscos decorrentes da manipulação de amostras biológicas, a instituição adquiriu quatro novas cabines de segurança biológica pipetadores automáticos, uma geladeira para solventes, torneiras com sensor elétrico, lixeiras com pedal e uma máquina de lavar vidraria.

Calhoun<sup>3</sup> identifica os agentes específicos de “stress” para os profissionais da saúde como relacionados a reações adversas a este, como: sobrecarga de trabalho, insegurança no trabalho, inadequação das capacidades do indivíduo ao tipo de trabalho realizado, ambigüidade de papéis, não participação nas decisões ou planejamento, subaproveitamento das suas capacidades, recursos inadequados, mudanças tecnológicas rápidas, sentimentos de imortalidade (exposição continuada à morte), etc. O autor aponta ainda a carga horária como uma das principais fontes de “stress”. A maioria dos acidentes ocorridos neste estudo ocorreu após três horas do início da jornada de trabalho. A sobrecarga de atividades decorrente da falta de pessoal e o aumento do número de exames (período de epidemias) acarreta ansiedade e fadiga, podendo aumentar assim os riscos de acidentes. Uva e Faria<sup>14</sup> classificam os fatores de risco de origem profissional a que se encontram expostos os trabalhadores da saúde, em quatro categorias conforme a sua natureza: físicos, químicos, biológicos e psico-sociais, sendo que nesta última encontra-se o “stress” ocupacional devido à natureza do trabalho realizado (no caso dos profissionais de saúde). A grande importância dos fatores de natureza psico-social reside na sua invisibilidade. Costa Neto<sup>5</sup> ressalta que entre os fatores de risco inerentes às atividades desenvolvidas pelos profissionais, há uma série de fragilidades, sejam elas de origens estruturais, de recursos humanos, de capacitação, de procedimentos operacionais ou políticos.

O aumento do número de acidentes ocorridos com os profissionais de nível médio e básico, em 2001 a 2002, pode ser associado com a sobrecarga de trabalho (nos casos das epidemias de dengue); à falta de funcionários, especialmente no setor de lavagem e esterilização; e ao uso incorreto e incompleto de EPIs e EPCs. Cabe ressaltar ainda que o profissional da recepção de material tem maior contato com diferentes tipos de amostras, pois recebe todo o material que chega para análise e o distribui para as diversas áreas do

laboratório. Souza<sup>12</sup> estudando os acidentes ocupacionais e situações de risco para a equipe de enfermagem em cinco hospitais do município de São Paulo observou que a categoria funcional que mais se acidentou foi a de auxiliar de enfermagem porque as atividades desenvolvidas por eles são as de contato mais direto com o paciente e seus fluidos corpóreos; as de preparo e administração de medicamentos; coleta de material para laboratório (sangue, urina, fezes e escarro) e cuidados de higiene. Desde março de 1998 o grupo de biossegurança deste laboratório realizou diversas atividades de prevenção tais como: treinamento de incêndio, com vistoria do prédio pelo Corpo de Bombeiros; o I Encontro Regional de Biossegurança, em 2000; a apresentação de módulos do “Programa de Segurança em Laboratório”, em 2001; os cursos do Programa Nacional de DST/AIDS, do Ministério da Saúde, em 2002; a apresentação de um vídeo educativo tendo como tema a biossegurança em laboratório, produzido a partir de uma peça de teatro elaborada por funcionários do laboratório, em 2001 e 2002; além de treinamentos e reuniões com as chefias para discussões de atividades específicas.

Considerando-se que o número de acidentes no ano de 2002 foi relativo a apenas quatro meses, parece ter havido um aumento neste número, mas este aumento pode ser devido simplesmente a um aumento no número de relatos de acidentes neste período, provável consequência de uma maior conscientização dos indivíduos decorrente do trabalho realizado pelo grupo de biossegurança local nos dois últimos anos. Anteriormente muitas vezes os acidentes deixavam de ser relatados, fosse por descaso em relação ao próprio risco; por resistência à implantação rígida das práticas de biossegurança; ou por desconhecimento e medo de reprimendas, principalmente quando o acidentado sabia não estar cumprindo os procedimentos corretos por pressa ou outro motivo qualquer, ou porque não estava usando os EPIs adequados. O trabalho de conscientização baseado no princípio “a importância de cada um na segurança de todos”, deve, aos poucos, ir substituindo nas pessoas o medo e o descaso pelo sentimento de responsabilidade pelo seu próprio bem estar e da comunidade ao redor.

Conclui-se, portanto, que é de fundamental importância a prevenção de acidentes frente a situações de risco em laboratório, e que a conscientização e responsabilidade na observação das normas de biossegurança envolve os profissionais em todos os níveis. Todos os acidentes e incidentes devem ser documentados e avaliados visando a identificação das causas e suas possíveis correções. Devem ser elaborados em todos os laboratórios mapas de riscos objetivando reunir as informações necessárias para estabelecer o diagnóstico da situação de segurança e possibilitar, durante a sua elaboração, a troca e divulgação de informações entre os trabalhadores, bem como estimular a participação destes nas atividades de prevenção<sup>11</sup>. Cada laboratório deverá desenvolver ou adotar um manual que identifique os riscos e especifique as práticas e procedimentos específicos para minimizar ou eliminar



as exposições a estes perigos. A equipe, as práticas de segurança e as técnicas laboratoriais deverão ser complementadas com um projeto apropriado das instalações e das características da arquitetura, do equipamento de segurança e das práticas de gerenciamento<sup>2</sup>. Os programas educacionais e

o uso adequado de equipamentos são medidas importantes para um trabalho seguro, mas por outro lado, sem a conscientização com mudança de postura de cada funcionário, o esforço daqueles que trabalham pela biossegurança esbarra em dificuldades intransponíveis.

RIALA6/946

Simões, M. et al. - Individual and collective protection equipments (IPE and CPE) wearing in a health public laboratory accidents from may 1998 to may 2002. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 105 - 109, 2003.

**ABSTRACT.** The Health National System and international organizations have given a special attention to the health workers. The goal of this study is to evaluate 38 accidents from May 1998 to May 2002 in public health laboratory, the relation with the IPEs and CPEs adequate uses or the incorrect uses by the professionals and the influence of worked time when the accident happened. The data were obtained from the accident registration organized by the biosafety staff and it was filled during the interview with the injured. The accidents were classified in five groups according to their causes: - burn (by hot, cold and acid); sharp instruments; biologic samples; samples transport and fire. Thirty eight accidents were reported involving 30 workers: 7 (18,42%) in 1998 (May to December); 10 (26,32%) in 1999; 7 (18,42%) in 2000; 7 (18,42%) in 2001 and 7 (18,42%) in 2002 (January to May). The most frequent accident (37%) occurred handling biologic samples, followed by sharp instruments (24%). The IPE had been used incorrectly or incompletely during the 22 accidents. In biologic samples accidents, the causes were using IPEs and CPEs to around incorrectly or in incompletely way. We conclude that training prevention is very important in a laboratory routine. Moreover all the professionals in the laboratory need to be aware and responsible with biosafety guidelines.

**KEY WORDS.** biosafety, laboratory, accidents, IPE, CPE

#### REFERÊNCIAS

1. Almeida, I. M. Quebra de Paradigma. **Revista Produção**, 125: 80-5, 2002.
2. Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Serviço de Saúde Pública. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia**, 4ª ed., Washington, CDC, 1999, 275p.
3. Calhoun, G. Hospitals are high-stress employers. **Hospitals**, p. 171-6, 1980.
4. Costa, M.A.F. **Qualidade em biossegurança**. Rio de Janeiro, Qualitymark Ed., 2000, 116p.
5. Costa Neto, C. et al. Análise de riscos em laboratórios de saúde pública no Brasil. **Livro de resumos do II Congresso Brasileiro de Biossegurança e II Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos, ANBio**. Salvador, BA, Brasil, p.187-8, 2001.
6. Fayel, B. J. et al. Frequency of nonparenteral occupational exposures to blood and body fluids before and after universal precautions training. **Am. J. Med.**, 90 (2): 145-53, 1991.
7. Moreira, M. et al. Avaliação de acidentes percutâneos e percentil de soroconversão em profissionais de saúde de um hospital. **Livro de resumos do Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar**, 6. Campos do Jordão, SP, Brasil, p. 224, 1998.
8. Oda, L.M.; Ávila, S.M. et al. (org.). **Biossegurança em laboratórios de Saúde Pública**. 2ª ed., Brasília: Ministério da Saúde e Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, 1998. 304p.
9. Siqueira, L.F.G. et al. Biossegurança em laboratórios de DST, Parte I. **Rev. Bras. de Saúde Ocupacional**, 65 (17):, São Paulo, 1989, p.16-24.
10. Siqueira, L.F.G. et al. Biossegurança em laboratórios de DST, Parte II. **Rev. Bras. de Saúde Ocupacional**, 65 (17): São Paulo, 1989, p.24-32.
11. Souza, M.M. **Biossegurança no laboratório clínico**. Teresópolis, RJ, Livr. e Edit. Eventos, 1998, 291 p.
12. Souza, M. **Acidentes ocupacionais e situações de risco para a equipe de enfermagem: um estudo em cinco hospitais do município de São Paulo**. São Paulo, 1999. [Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo].
13. Sperandio, J.C. Les processus cognitifs au cours du travail. In: Cazamian, P.; Hubault, F.; Noulain, M. **Traité d'ergonomie**. Toulouse: Octares Édition, 1996, p.181-90.
14. Uva, A.S. e Faria, M. **Riscos Ocupacionais em hospitais e outros estabelecimentos de saúde**. Edição conjunta do SIM e da FNAME, 1992.

Recebido em 21/10/2002 ; Aprovado em 12/06/2003





## Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil

### Ocurrence of *Salmonella* spp in chicken meat marketed in Bauru, SP, Brazil

Daniel P. MATHEUS<sup>1\*</sup>  
Aristides C. RUDGE<sup>2</sup>  
Sônia M. M. GOMES<sup>3</sup>

RIALA6/947

Matheus, D.P.; Rudge, A.C.; Gomes, S.M.M - Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 111 - 115, 2003.

**RESUMO.** *Salmonella* spp é um dos patógenos mais comumente relacionados com enfermidades transmitidas por alimentos em humanos e é, freqüentemente, associada com o consumo de aves e produtos derivados, no Brasil e no mundo. Este estudo foi conduzido para avaliar a contaminação de carcaças de frango resfriadas, comercializadas diretamente ao consumidor, no município de Bauru, São Paulo, Brasil. No período de abril de 1996 a agosto de 1999, foram coletadas 102 amostras no comércio varejista para pesquisa de *Salmonella* spp. Dessas, seis (5,9%) foram positivas para *Salmonella* e, entre os sorotipos isolados, *S. Enteritidis* foi o mais freqüente com quatro (66,7%) isolamentos, seguido de um (16,7%) isolamento de *S. Ouakam* e um (16,7%) de *S. Saintpaul*. Apesar dos resultados terem demonstrado uma porcentagem de contaminação menor do que a verificada em outras pesquisas, os resultados obtidos para *S. Enteritidis* são semelhantes ao de pesquisas recentes, reforçando a tendência deste sorotipo configurar um problema de Saúde Pública no município de Bauru, SP.

**PALAVRAS-CHAVE.** *Salmonella*, carne de frango.

Endereço para correspondência:

<sup>1\*</sup> Mestre em Vigilância Sanitária e Méd. Vet. da Vig. Sanitária da DIR-X-Bauru/SP  
Rua Alexandre Neme, nº 1-73- Vila Pacífico- Bauru- SP- CEP: 17050-400 –  
e- mail: daniel\_matheus@uol.com.br

<sup>2</sup> Prof. Doutor da FMVZ - UNESP – Botucatu – SP

<sup>3</sup> Biologista Chefe do Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz – Bauru – SP

## INTRODUÇÃO

A obtenção de proteína animal para alimentação é caracterizada por uma intrincada rede de operações destinada a produzir, sacrificar, descarnar, distribuir, armazenar e preparar para o consumo humano, a carne e as vísceras de animais domésticos, mamíferos ou não, sobretudo os bovinos, suínos, ovinos e aves. Porém, alimentos de origem animal, especialmente carnes, são uma das mais importantes fontes de muitas bactérias responsáveis por enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs). Microrganismos presentes nos animais vivos podem ser veiculados pelas carnes cruas após o abate, podendo persistir no produto final, se não forem aplicadas as boas práticas de produção por parte dos manipuladores ao longo da cadeia de produção<sup>31</sup>.

Durante o processamento de carcaças de frango, pode ocorrer a contaminação do próprio ambiente, dos manipuladores e contaminação cruzada de outras aves contaminadas. O rápido crescimento da indústria avícola proporcionou uma fonte de proteína rapidamente disponibilizada e de custo reduzido, mas também aumentou a taxa de infecção das aves e conseqüentemente a contaminação das carcaças<sup>13,25,30</sup>.

O gênero *Salmonella* compreende duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. Essa duas espécies contém atualmente 2501 sorotipos. A maioria das cepas isoladas do homem e dos animais domésticos pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica*, que são designadas como gênero *Salmonella* em itálico e a primeira letra do sorotipo é escrita em maiúscula<sup>21</sup>. Estes organismos podem infectar uma enorme variedade de hospedeiros (incluindo humanos) resultando, em algumas situações, em portadores e, em outras instâncias, causando doenças<sup>5,21</sup>.

Infecções de aves domésticas por *Salmonella* costumam ser dispendiosas, tanto para a indústria avícola como para a sociedade como um todo. Os custos associados com salmonelose em aves recaem em duas amplas categorias. A primeira se refere aos gastos associados com a doença humana, causada pelo consumo de produtos avícolas contaminados. Em países que possuem vigilância e notificação de salmonelose humana observa-se que a doença é responsável por incidências anuais significativas e, conseqüentemente, gera um custo social considerável<sup>27</sup>. A segunda categoria de custos associados com salmonelose em aves envolve várias despesas decorrentes das infecções por *Salmonella* em seus plantéis<sup>13,19</sup>. Além disso, a publicidade negativa gerada pela mídia pode, também, afetar a demanda dos consumidores desses itens, prejudicando a lucratividade dos produtores<sup>13,26</sup>.

Apesar de, no Brasil, existirem iniciativas no sentido da elaboração de um sistema de informação sobre salmonelose, são poucos os dados disponíveis. No Estado de São Paulo, o Sistema de Vigilância de Enfermidades Transmitidas por Alimentos - VETA, implantado em 1994, está reforçando a hipótese da salmonelose ser um problema de Saúde Pública no

Estado de São Paulo, e que surtos epidêmicos e casos isolados da doença estão ocorrendo ainda sem a devida notificação<sup>23</sup>.

Na região de Bauru, SP, foram registrados 4 surtos humanos durante o período de fevereiro de 1995 a maio de 1996, envolvendo 195 pessoas no total. Em 3 destes surtos foram isolados *S. Enteritidis* e no outro *S. Infantis*. Os dados apresentados pelo Sistema VETA nos anos de 1995, 1996 e 1997 confirmam a importância da *Salmonella* spp como causadora de surtos em nosso meio, demonstrando um elevado percentual entre as ocorrências de destaque nesse período<sup>24</sup>.

Em vista do exposto, o presente estudo foi planejado de forma à contribuir com a Saúde Pública, no sentido de fornecer dados concretos em relação às condições sanitárias da carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, quanto à contaminação por *Salmonella* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Entre abril de 1996 e agosto de 1999, foram analisadas 102 amostras de carcaças de frango resfriadas, colhidas aleatoriamente no comércio varejista de Bauru, SP.

Nos pontos de venda, procedeu-se à colheita da amostra de frango resfriado, inteiro, com embalagem original do abatedouro de que era procedente, dotado de inspeção sanitária. Na maioria dos estabelecimentos visitados, encontrou-se apenas uma marca de frango exposta à venda. Nos locais onde havia mais de uma marca de frango resfriado, colhia-se amostras de cada uma delas.

As amostras foram colhidas conforme as "Normas de Coleta de Amostras de Alimentos", estabelecidas pelo Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central de São Paulo<sup>14</sup>, devidamente identificadas. Em seguida, foram colocadas em caixas de material isotérmico, contendo blocos de gelo reciclável e imediatamente levadas ao Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz, em Bauru, SP, onde foram realizados os ensaios de isolamento e identificação de *Salmonella*.

### Metodologia

A metodologia empregada foi a recomendada pela American Public Health Association<sup>12</sup>, com modificações pertinentes relacionadas à substituição do caldo de pré-enriquecimento por água peptonada 1% tamponada, introdução do meio de enriquecimento seletivo Rappaport- Vassiliadis e dos meios de isolamento Verde Brilhante (adicionado de Novobiocina) e *Salmonella-Shiguela*. Após o pré-enriquecimento em água peptonada 1% tamponada (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1 ml de cada amostra foi semeado em 10 ml de caldo Selenito- Cistina (Difco, Detroit, Estados Unidos) e de caldo Rappaport- Vassiliadis (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), os quais foram incubados por 24 horas a 42°C para enriquecimento seletivo de *Salmonella*. Na seqüência, esses meios foram semeados em placas de Ágar *Salmonella-Shigella* (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Ágar Verde Brilhante (Merck, Darmstadt, Alemanha), acrescentando-se 0,002% de novobiocina (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) no

Ágar Verde Brilhante<sup>29</sup> e incubando- as por 24 a 48 horas a 37°C. As colônias suspeitas presentes nesses meios de isolamento foram submetidas à identificação bioquímica e confirmadas sorologicamente com os soros polivalentes somático (O) e flagelar (H) (Probac, São Paulo, Brasil). As cepas confirmadas nesta fase foram posteriormente encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para identificação sorológica completa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 102 amostras de carcaças de frango resfriadas analisadas, 6 foram positivas para *Salmonella* spp, o que corresponde a 5,9% das amostras. Dessas, 4 (66,7%) foram identificadas como *S. Enteritidis*, 1 (16,7%) como *S. Ouakam* e 1 (16,7%) como *S. Saintpaul*. *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais isolado.

Na última década, diversos países têm relatado o aumento no número de surtos ocasionados por *S. Enteritidis*, constituindo-se na maior causa de surtos de ETAs nos Estados Unidos, Reino Unido e Europa Central, aceitando-se que está em curso uma pandemia<sup>11,32</sup>.

Muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de isolar *Salmonella* de carcaças de frango resfriadas comercializadas no varejo, tanto em estabelecimentos do segmento de supermercados, como também nos estabelecimentos de porte menor, como os açougues e casas especializadas somente no comércio de aves e seus derivados.

Pesquisas de *Salmonella* em carcaças de frangos, realizadas nas décadas de 70 e 80 no Brasil, detectaram valores muito superiores aos encontrados no presente trabalho<sup>3,6,9,10</sup>. Observou-se nesses estudos, que o sorotipo *S. Enteritidis* não era freqüente nessa época, com os sorotipos *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Newport*, *S. Give*, *S. Mbandaka* e *S. Bredeney*, entre outros, sendo os mais freqüentes. Segundo esses autores, a maior ocorrência dessa bactéria naquela época pode ter sido devido à falta de condições higiênicas e sanitárias satisfatórias nos estabelecimentos de abate pesquisados. A implementação das boas práticas de produção e utilização do sistema HACCP- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, contribuiu para melhorar esse quadro<sup>8</sup>.

No entanto, a partir de 1993<sup>16</sup>, verifica-se um aumento na freqüência de isolamento de *S. Enteritidis* em nosso meio, corroborando o paradigma de Gast<sup>13</sup> e Taunay et al.<sup>28</sup>, de que a distribuição dos sorotipos de *Salmonella* oriundos das aves varia geograficamente e muda com o passar do tempo. Pesquisas realizadas em municípios brasileiros, em condições semelhantes às encontradas no município de Bauru, SP, também revelaram a prevalência do sorotipo *S. Enteritidis* em carne de frango<sup>4,15,18,22</sup>.

Vieira e Teixeira<sup>30</sup> em Poços de Caldas, MG, por outro lado, não detectaram a presença de *Salmonella* nas 36 amostras de carcaças de frango resfriadas, comercializadas no varejo, entre janeiro e março de 1996. Esta não detecção pode ter sido devido à presença de elevada população competitiva nessas

amostras, pela metodologia empregada e também pelo pequeno número de amostras analisadas.

Estudos conduzidos em outros países revelaram uma incidência de *Salmonella* em carnes de frango maior do que a detectada nesta pesquisa, como em Madrid, na Espanha, por Arroyo e Arroyo<sup>1</sup>, e no Reino Unido, por Plummer et al.<sup>20</sup>.

Ainda no Reino Unido, Jobson<sup>17</sup> estudou a incidência de *Salmonella* em 601 amostras de frangos, entre 1993 e 1994, e concluiu que houve uma tendência de queda na contaminação da carne de frango a partir de 1990, de 54% para 41% em frangos congelados e de 41% para 33% em frangos resfriados. Esta tendência de diminuição da contaminação poderia explicar o menor grau de contaminação observado na presente pesquisa pois, os resultados aqui obtidos apresentaram valores menores em comparação com pesquisas realizadas no início da década de 90, em outras localidades<sup>18</sup>. Mesmo na Malásia, em pesquisa no comércio varejista, Arumugaswamy et al.<sup>2</sup>, encontraram contaminação por *Salmonella* em 32% de 219 amostras de alimentos crus, dos quais, uma grande proporção era originária de carne e miúdos de frango.

Podemos ainda aventar a hipótese de que possa estar havendo uma melhora na qualidade microbiológica dos frangos resfriados comercializados em Bauru, em virtude dos segmentos da cadeia alimentar do frango de corte estarem se adequando às normas sanitárias nacionais e internacionais em vigor. Estas adequações estão relacionadas ao monitoramento de *Salmonella* desde a incubadora até o produto acabado, com a implementação de estratégias mínimas de controle de *Salmonella* exigidas atualmente pelo Código de Defesa do Consumidor, Legislação Sanitária Nacional e barreiras sanitárias internacionais para exportação e importação<sup>7</sup>.

Os dois outros sorotipos identificados neste estudo, foram a *S. Saintpaul* e *S. Ouakam*. Entre 1950 e 1990, Taunay et al.<sup>28</sup> relataram a presença de *S. Saintpaul* em 151 amostras de material clínico, e em 37 amostras de alimentos e animais. Nesse mesmo período não constataram o isolamento de *S. Ouakam*.

Lírio et al.<sup>18</sup> relatam a identificação de apenas uma amostra de alimento contaminado por *S. Saintpaul* entre 1992 e 1996 e nenhuma identificação de *S. Ouakam*, em amostras de alimentos contaminados em São Paulo/SP.

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam que a presença de *Salmonella* em carcaças de frango comercializadas no município de Bauru, SP, constitui um fator de risco para a saúde pública e que a *S. Enteritidis* é o sorotipo de maior incidência no produto pesquisado.

Do ponto de vista de vigilância sanitária, os resultados dessa pesquisa apontam que é necessária a implantação de programas específicos para o controle de *Salmonella* para minimizar os fatores que contribuem para a multiplicação desta bactéria e a implementação de treinamento de pessoal em todos os segmentos da cadeia produtiva.

Matheus, D.P.; Rudge, A.C.; Gomes, S. M. M - Occurrence of *Salmonella* spp in chicken meat marketed in Bauru, SP, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 111 - 115, 2003.

**ABSTRACT.** *Salmonella* spp is responsible for most of the foodborne disease occurred worldwide, and it is often associated with poultry and their products. This study has been conducted to evaluate the contamination of chilled chicken carcasses in retail market, in Bauru, São Paulo, Brazil. From April, 1996 to August, 1999, one hundred and two samples were analysed for the presence of *Salmonella* spp. Six samples (5.9%) were positive for *Salmonella*, and among the isolates, *S. Enteritidis* strain was the most frequent (66.7%), followed by *S. Ouakam* (16.7%) and *S. Saintpaul* (16.7%). Although results showed a contamination rate smaller than that found in other researches, the greatest frequency of isolation for *S. Enteritidis* showed a behavior that was similar to other recent studies, thus strengthening this serotype trend to become a problem for Public Health in Bauru, SP, Brazil.

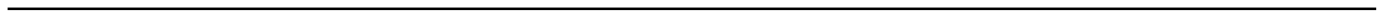
**KEY WORDS.** *Salmonella*, chicken meat.

## REFERÊNCIAS

1. Arroyo, G.; Arroyo, J. A. Detection of *Salmonella* serotypes in edible organ meats from markets in Madrid, Spain. **Food Microbiol.** 12:13-20, 1995.
2. Arumugaswamy, R. K.; et al. Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia. **Food Microbiol.**, 12:3-8, 1995.
3. Ávila, F. A.; Ferreira, M. D.; Silva, E. D. *Salmonella* em carcaças de aves manipuladas nos abatedouros de Belo Horizonte. **Arq. Esc. Vet. U.F.M.G.**, 26:211-4, 1974.
4. Baú, A. C.; Carvalhal, J. B.; Aleixo, J. A. G. *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS. **Hig. Alim.**, 13:26, 1999. (Resumo).
5. Benenson, A. S. **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre.** Washington: OPAS, 1992. p. 458-63.
6. Berchieri Jr., A.; et al. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **Ars. Vet.**, 3:81-7, 1987.
7. Brasil. Lei nº 7889, de 23 de Novembro de 1989. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 de Novembro de 1989. Seção 1, parte 1, 1p.
8. Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária - MAA. Portaria nº 210, 10 de Novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Republicado no **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de Março de 1998. Seção 1, nº 43, p. 17-23.
9. Cunha Netto, S. J.; Brant, P. C.; Pessoa, G. V. A. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças de frango de corte em 3 abatedouros de Belo Horizonte, MG. **Arq. Esc. Vet. U.F.M.G.**, 28:125-9, 1976.
10. Cunha Netto, S. J.; Brant, P. C.; Pessoa, G. V. A. Sorotipos de *Salmonella* isolados de Concentrado, Cama e Carcaças de Frangos de Corte em duas granjas em Goiania, GO., 1974. **Arq. Esc. Vet. U.F.M.G.**, 34:337-44, 1982.
11. Dawson, P. S. Control of *Salmonella* in poultry in Great Britain. **Int. J. Food Microbiol.**, 15:215-7, 1992.
12. Flowers, R. S.; et al. *Salmonella*. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. **Compendium of methods for microbiological examinations of foods.** 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992, p. 371- 422.
13. Gast, R. K. Paratyphoid infections. In: Calnek, B.N. **Diseases of poultry.** 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997, p.97-121.
14. Gelli, D. S.; et al. **Normas de coletas de amostras de alimentos.** São Paulo: L.C.I.A.L., 1989. 85 p.
15. Gonçalves, P. M. R.; Franco, R. M.; Zamborlini, L. C. - Enumeração de enterococos e coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* e indicação presuntiva de *Proteus*, em cortes e miúdos de frangos (*Gallus domesticus*) congelados. **Hig. Alim.**, 12:42-7, 1998.
16. Irino, K.; et al. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 38:193-6, 1996.
17. Jobson, B. *Salmonella* in UK produced retail raw chicken. London: **UK Department of Health (Report)**, 1995. (Abstract).
18. Lírio, V. S.; et al. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Hig. Alim.**, 12:36-42, 1998.
19. Mulder, R. W. A. W. Impact of transport and related stresses

- on the incidence and extent of human pathogens in pigmeat and poultry. **J. Food Saf.**, 15:239-46, 1995.
20. Plummer, R. A. S.; Blissett, S. J.; Doss, C. E. R. *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in the U.K. **J. Food Prot.**, 58:843-6, 1995.
  21. Popoff, M. Y.; et al. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, 152: 907-909, 2001.
  22. Sá Barreto, E. S.; Ramos, S. M. Pesquisa de *Salmonella* em cortes congelados de frango comercializados no município Rio de Janeiro. **Hig. Alim.**, 13:53-4, 1999. (Resumo)
  23. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde. **Sistema Veta-Vigilância de enfermidades transmitidas por alimentos**. São Paulo: C.V.S., 1994. 96 p.
  24. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde. **Análise dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos**. São Paulo: S.E.S./C.V.S., 1998. 20 p.
  25. Silva, E. N. *Salmonella* Enteritidis em aves e saúde pública. **Hig. Alim.**, 9:7-13, 1995.
  26. Silva, J. A. Microorganismos patogênicos em carne de frangos. **Hig. Alim.**, 12:9-12, 1998.
  27. Sockett, P. N. The epidemiology and cost of diseases of public health significance, in relation to meat and meat products. **J. Food Safety**, 15:91-112, 1995.
  28. Taunay, A. E.; et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 38:119-27, 1996.
  29. Tate, C. R.; et al. The isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. **Poultry Sci.**, 69:721-6, 1990.
  30. Vieira, C. R. N.; Teixeira, C. G. Condições higienico-sanitárias de carcaças de frango resfriadas comercializadas em Poços de Caldas, MG. **Hig. Alim.**, 11:36-40, 1997.
  31. WHO - World Health Organization Control of *Salmonella* infections in animals and prevention of human foodborne *Salmonella* infections. **Bull. WHO**, 72:831-3, 1994.
  32. Wierup, M.; Engström, B.; Engvall, A.; Wahlström, H. Control of *Salmonella* Enteritidis in Sweden. **Int. J. Food Microbiol.**, 25:219-26, 1995.

Recebido em 09/10/2001 ; Aprovado em 03/07/2003



## Níveis de Arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (*Leporinus obtusidens* e *Pimelodus maculatus*) do Lago Guaíba em Porto Alegre RS-Brasil

Total Arsenic levels as a bioindicator in the evaluation of fish quality (*Leporinus obtusidens* and *Pimelodus maculatus*) from the Guaiba Lake, Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil

Roseli de O. MÖLLERKE<sup>1\*</sup>  
Isa B. NOLL<sup>2</sup>  
Maria Aparecida B. E. SANTO<sup>3</sup>  
Diego M. NORTE<sup>4</sup>

RIALA6/948

Möllerke, R. de O. et al.- Níveis de Arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (*Leporinus obtusidens* e *Pimelodus maculatus*) do Lago Guaíba em Porto Alegre RS-Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 117 - 121, 2003.

**RESUMO.** Foram avaliadas, quanto a presença de arsênio, 27 amostras de *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) “Piava” e 27 de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) “Pintado”, capturados no Lago Guaíba, P.Alegre, RS. Os níveis de arsênio total foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com gerador de hidretos. Os níveis encontrados estavam abaixo de 1,0 mg/kg, limite tolerado pela legislação vigente no Brasil para peixes e seus produtos. A média encontrada nas Piavas foi de 0,14 mg/kg e nos Pintados 0,14 mg/kg. Os resultados sugerem mais estudos de monitoramentos em outras espécies de peixes do lago, para que os dados obtidos possam ser utilizados pelas autoridades de preservação ambiental na proteção da saúde humana e qualidade dos alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE.** arsênio, *Leporinus obtusidens*, *Pimelodus maculatus*, Lago Guaíba, metais pesados, pescado.

Endereço para correspondência:

\*<sup>1</sup> Doutora, Professora Adjunta, Faculdade de Veterinária da UFRGS, \*Av.Bento Gonçalves, 9090 CEP 90540-000, Porto Alegre-RS e-mail: roselim@adufgrs.ufrgs.br. Autora para correspondência.

<sup>2</sup> Doutora, Professora Adjunta, Instituto de Tecnologia de Alimentos da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 CEP 90540-000. Porto Alegre-RS. e-mail: isabnoll@adufgrs.ufrgs.br.

<sup>3</sup> Bel. Química, Fiscal Federal Agropecuário, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- Lara/RS, Estrada da Ponta Grossa, 3036 CEP 91780-580 Porto Alegre -RS e-mail: cida@cpovo.net

<sup>4</sup> Acadêmico da Faculdade de Veterinária da UFPEL, Av. Nilópolis, 155-201. CEP 90460-050. Porto Alegre-RS. e-mail: diegon@cpovo.net



## INTRODUÇÃO

O Lago Guaíba está inserido na porção final de uma bacia hidrográfica que drena 30% da área do Estado do Rio Grande do Sul. Este lago encontra-se em frente a Porto Alegre e ao sul do Parque Estadual do Delta do Jacuí, um arquipélago de 18 ilhas originadas por depósitos de sedimentos carregados pelos rios que formam a Bacia. Possui área de 49.600 ha (496 Km<sup>2</sup>) e tem bacia de acumulação de água com capacidade de 1,5 bilhões de m<sup>3</sup> com extensão de 50 Km e largura variando de 1 a 20 km, com uma profundidade média de 2 m<sup>5,16</sup>.

Nesta bacia hidrográfica estão situados os núcleos industriais mais importantes do estado, concentrando dois terços da produção industrial e, conseqüentemente, 70% da população dos maiores centros urbanos, incluindo a capital Porto Alegre. O Guaíba é, portanto, o grande receptor dos efluentes produzidos na Região Metropolitana e no nordeste do estado<sup>3</sup>.

O Lago Guaíba representa importante manancial hídrico, tanto no aspecto social, como no biológico. No primeiro caso porque, além de proporcionar área de lazer, serve como principal fonte de abastecimento de água para mais de um milhão e trezentas e sessenta mil pessoas<sup>10</sup>. Com referência ao aspecto biológico, o Guaíba é um local de ocorrências sazonais de algumas espécies de peixes provenientes do sul da Lagoa dos Patos com 56 espécies residentes permanentes<sup>12</sup>. Contiguamente associado ao complexo de ilhas que formam o delta do Jacuí, o Guaíba abriga igualmente grande diversidade animal e vegetal. Menegat et al<sup>16</sup> e Torgan et al<sup>21</sup> comprovam que os locais menos contaminados deste lago ainda apresentam qualidade adequada à preservação dos organismos aquáticos.

No Rio Grande do Sul, o consumo de pescado é de 3,5 kg/hab/ano, bem aquém do preconizado pela FAO<sup>7</sup>, de 13,1 kg/hab/ano. Se, por hipótese, o consumo fosse estimulado para alcançar o recomendado pela FAO, a quantidade demandada aumentaria para, aproximadamente, 78.000 toneladas de pescado/ano somente no Rio Grande do Sul.

O problema da contaminação do meio ambiente por metais pesados alcança, hoje em dia, dimensões mundiais, sendo observado tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, devido à expansão industrial.

Os peixes, por serem consumidores e pertencerem ao nível superior do ecossistema aquático, acumulam poluentes, daí a sua grande importância em testes de toxicidade e contaminações<sup>6</sup>.

O arsênio, não tem características de essencialidade, como a tem outros metais (zinco, cobre, manganês e cromo), constituindo-se em objeto de preocupação dado a sua importância toxicológica. O efeito tóxico deste elemento depende da forma em que ele se encontra. Os compostos orgânicos são reconhecidamente menos tóxicos que os inorgânicos<sup>13</sup> e destes último, os compostos trivalentes são os mais tóxicos<sup>8</sup>.

A maioria dos alimentos de origem terrestre contém menos que 1µg de arsênio/g de peso seco; os níveis presentes nesses alimentos de origem marinha são substancialmente mais

altos, atingindo 80 µg/g. A ingestão da dieta é, portanto, grandemente influenciada pela quantidade de frutos do mar ingeridos<sup>18</sup>.

Ao arsênio é atribuída também atividade carcinogênica, estabelecendo-se associação epidemiológica entre câncer de pele, de fígado e de pulmão e ingestão prolongada de águas de abastecimento e vinhos contaminados ou contato ocupacional na produção de pesticidas e nas indústrias produtoras de ligas metálicas<sup>4</sup>.

A Organização Mundial da Saúde diminuiu a IDA (Ingestão Diária Aceitável) de 50mg/kg de peso corpóreo para 2mg/kg com a recomendação de que mais trabalhos sejam efetuados para elucidar a natureza do composto arsenical que ocorre nos alimentos, em particular, em alimentos marinhos, onde os níveis são geralmente mais elevados<sup>11,14</sup>.

A Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabeleceu que os níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos com relação ao arsênio em peixes e produtos de peixe é de 1,0 mg/kg<sup>1</sup>.

No Brasil existem poucos dados quanto a sua presença em alimentos de uma maneira geral e, sobre sua presença em peixes, muito pouco até o momento se encontra registrado.

As espécies biológicas, pelo exposto, podem ser usadas como sentinelas da existência da poluição arsenical a níveis perigosos.

A piava é a espécie mais comercializada na cidade de Porto Alegre e o pintado a mais consumida pelos pescadores e suas famílias, são também as espécies mais abundantes do Lago e a base econômica dos pescadores, pois além da venda do peixe inteiro, são utilizados no fabrico de subprodutos, como farinha de peixe.

Além do fator econômico a escolha destas espécies teve como base o habitat e os hábitos alimentares; a Piava, peixe de nível trófico baixo, vive no interior do lago e é herbívora enquanto o Pintado, de nível trófico elevado, é omnívoro, alimentando-se nas margens e também no sedimento<sup>9</sup>.

Levando-se em conta as considerações acima, este trabalho teve por objetivo determinar quantitativamente a presença de arsênio em duas espécies de peixes do Lago Guaíba, avaliar os riscos para a população consumidora deste pescado e fundamentar ações e políticas públicas de saúde subseqüentes.

## MATERIALE MÉTODOS

Foram adquiridos, de pescadores artesanais do Lago Guaíba, durante os meses de junho de 2000 até setembro de 2001, originários de três locais de captura no lago; no Delta, à jusante do Lago e no canal de navegação, 27 amostras de piava (denominação local) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) e 27 de pintado do Guaíba (denominação local) *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803).

Os peixes foram adquiridos frescos e levados ao laboratório em caixas de isopor. As amostras (músculo) livre de

gordura e tecido conjuntivo foram analisadas em triplicata, conforme Procedimento Operacional Padrão EAA método 400/01<sup>2</sup>. O arsênio foi determinado quantitativamente após mineralização por via seca com nitrato de magnésio/ácido nítrico, dissolução da cinza com ácido clorídrico e posterior diluição com água destilada e deionizada (1:10). A arsina foi gerada pela técnica de hidretos no equipamento MHS - 10 Perkin - Elmer e quantificada no espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer modelo 2380, utilizando-se lâmpada EDL específica para arsênio, num comprimento de onda de 193 nm<sup>22</sup>.

A validação do método foi realizada conforme Procedimento Operacional Padrão; Validação de metodologias analíticas quantitativas por espectrofotometria de absorção atômica do MAPA/LARA/PORTO ALEGRE/RS - Seção de Análise Físico- Química – Setor de Espectrofotometria de Absorção Atômica<sup>2</sup>.

O limite de detecção foi de 5 mg/kg e o limite de quantificação de 10 mg/kg.

Quanto a recuperação a média dos valores testados para 20 repetições de fígado foi de 102,55 %, o desvio padrão 8,06 e o coeficiente de variação: 7,86. Para 16 repetições de rim a recuperação média foi 100,46 %, o desvio padrão: 5,86 e o coeficiente de variação: 5,84.

A curva padrão de As foi linear de 5 a 40 mg/kg e o coeficiente de correlação de 0,9908.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de arsênio total analisados nas piavas variaram de 0,01 a 0,38 mg/kg e a concentração média e o desvio padrão foram de  $0,14 \pm 0,09$  mg/kg respectivamente e nos pintados variou de 0,03 a 0,56 mg/kg e a média e o desvio padrão foram de  $0,14 \pm 0,15$  mg/kg respectivamente. Nenhuma amostra ultrapassou o limite tolerado pela legislação vigente no país de 1,0 mg/kg para peixes<sup>1</sup>. Não houve diferença na média entre as duas espécies. Nas análises estatísticas utilizou-se o teste de t de Student.

Muñoz et al<sup>17</sup>, na Espanha determinaram arsênio total e inorgânico em espécies de peixes e em outros frutos do mar, onde o teor de arsênio total em 66% das amostras estavam acima do permitido pela legislação Espanhola, para arsênio total, o mesmo do Brasil para peixes e frutos do mar.

Storelli e Marcotrigiano<sup>19</sup>, por sua vez, encontraram

valores de arsênio entre 5,85 mg/kg e 61,5 mg/kg em cinco espécies de peixes capturados no Mar Adriático. Todas as amostras apresentaram valores acima dos limites estabelecidos pela legislação de vários países e os autores consideraram a variação dos resultados devido aos diferentes hábitos das espécies, principalmente das que tem seu habitat próximo ao sedimento.

No Brasil, Mantovani e Angelucci<sup>14</sup> determinaram os teores de arsênio em sardinhas e atum “in natura”, em dois períodos de aquisição das amostras, encontrando 1,53 e 1,58 mg/kg na sardinha inteira e 0,85 e 1,51 mg/kg no atum. Este trabalho também mostra a contaminação de espécies marinhas, que apresentam níveis de contaminação acima do limite permitido pela legislação brasileira, na maioria das amostras.

Em 1983, Teixeira et al<sup>20</sup> analisaram por colorimetria, no então Rio Guaíba, várias espécies de peixes com relação aos níveis de arsênio na musculatura e vísceras, encontrando valores que variaram de ND - 1,00 mg/kg e ND a 3,98 mg/kg, respectivamente. É interessante observar que, para as mesmas espécies analisadas no mesmo lago, a musculatura da Piava apresentou valor médio de 0,90 mg/kg e a do Pintado 0,39 mg/kg, resultados mais elevados do que os do presente trabalho, determinados por espectrofotometria. As metodologias diferentes empregadas poderiam justificar os resultados encontrados, uma vez que métodos mais sofisticados apresentam maior sensibilidade.

A contaminação por arsênio também foi avaliada por Melo et al<sup>15</sup> em polpa e filé de 7 espécies de pescado de água doce, criados em tanques e alimentados com ração (não incluindo pintado e piava), em Pirassununga, SP. Os valores encontrados, também por espectrofotometria de absorção atômica, em filés variaram de 0,027 a 0,066 mg/kg, resultados que diferem aos encontrados para piava e pintado, 0,144 e 0,142 mg/kg, em média, respectivamente, no presente trabalho. As características ambientais, alimentares e os hábitos das diferentes espécies analisadas poderiam explicar estas diferenças.

Os resultados encontrados evidenciam a necessidade de mais trabalhos, monitorando outras espécies incluindo água e sedimento, buscando mais dados que possam servir de subsídio para as autoridades locais encarregadas de preservar e vigiar o ambiente, a saúde da população e os alimentos.

Möllerke, R. de O. et al.- Total Arsenic levels as a bioindicator in the evaluation of fish quality (*Leporinus obtusidens* and *Pimelodus maculatus*) from the Guaiba Lake, Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 117 - 121, 2003.

**ABSTRACT.** Levels of arsenic were detected in 27 samples of *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) and 27 samples of *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) from Guaíba Lake, Porto Alegre, RS. The methodology utilized involved digestion with Mg/NO<sub>3</sub>, solubilization with HCl and further dilution with de-ionized water (1:10). Arsenic detected by Atomic Absorption Spectrophotometer (MHS - 10 Perkin - Elmer). Data obtained showed that the average levels found in *P. maculatus* (0,14 mg/kg) and in *L. obtusidens* (0,14 mg/kg) were under 1,0 mg/kg, the recommended limit by Brazilian authorities for fish and fish products. Results suggest that more studies are necessary, monitoring other fish species, looking for more data that can be used by local authorities, regarding environmental preservation, human health protection and food quality.

**KEY WORDS.** arsenic, *Leporinus obtusidens*, *Pimelodus maculatus*, artless fish, Guaiba Lake, heavy metals.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria n 685 de 27 de agosto de 1998. Regulamento técnico. Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 28 de agosto de 1998. n 165, p 28 e 29. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/portaria/685\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portaria/685_98.htm). Acesso em 17 jul.2001.
2. Brasil Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Análise de Arsênio por Espectrofotometria de Absorção Atômica – EAA Método nº 400/01**. Manual de Métodos de Análise de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Brasília DF: MAPA, 2001.
3. Brutto, L. F. G. **Ecologia humana e etnoecologia em processos participativos de manejo**: o caso do Parque Estadual de Itapuã, RS, e os pescadores artesanais. 2001, 106 f. Dissertação. ( Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Faculdade de Biologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2001.
4. Casarett, L.J.; Doull, J. **Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos**. Lisboa: McGraw-Hill, 2001. 864p.
5. Comitê da Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba. Qualidade da água no Lago Guaíba. **Caderno de Informações**, nov., 2000.
6. Dias, E.R.A.; Teixeira Filho, A.R. A utilização de peixes como animais para experimentação. **Higiene Alimentar**, 8(31): 14-16, 1994.
7. FAO **Fao Yearbook**, Roma, 1994. (FAO Fischeris Series, n.44).
8. Flanjak, J. Inorganic and organic arsenic in some commercial east Australian crustaceae. **J. Food Sci.**, 33: 579 - 583, 1982.
9. Hartz, S.M. et al. Alimentação da Piava, *Leporinus obtusidens* (*Characiformes, Anostomidae*) no Lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, 6(1): 145-150, 2000.
10. IBGE. **Censo demográfico 2000**: sinopse preliminar. Brasília: 2001. Disponível em < [http://www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/populcao/censo 2000/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/populcao/censo%2000/default.shtm)>. Acesso 20 abr. 2001.
11. Lawrence, J.F. et al. Identification of arsenobetaine and arsenocholine in Canadian fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with atomic absorption detection and confirmation by fast atom bombardment mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 34(2): 315-319, 1986.
12. Lucena, C.; Jardim, A.; Vidal, E. Ocorrência, distribuição e abundância da fauna de peixes da praia de Itapuã, Viamão, RS, Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, 7: 3-27, 1994.
13. Lunde, G. Analysis of arsenic and selenic in marine raw materials. **J. Sci. Food Agric.** 21(5): 242 - 247, 1970.
14. Mantovani, D.M.B.; Angelucci, E. Avaliação do teor de arsênio em atum e sardinha. **Bol. SBCTA**, 26(1): 1-5, 1992.
15. Melo, L.F.C.; Morgano, M.A.; Mantovani, D.M.B. Avaliação do teor de arsênio total em pescado de água doce. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(2): 81-86, 1999.
16. Menegat, R. et al. **Atlas Ambiental de Porto Alegre**, Porto Alegre, Ed. da Universidade/UFRGS, 1998. 228p.
17. Muñoz, O. et al. Total and Inorganic Arsenic in Fresh and Processed Fish Products. **J. Agric. Food. Chem.**, 48: 4369-4376, 2000.
18. OMS. **Elementos traço na nutrição e saúde humanas**. São Paulo. ROCA. 1998. 297p.

19. Storelli, M.M.; Marcotrigiano, G.O. Organic and inorganic arsenic and lead in fish from the South Adriatic Sea, Italy. **Food Add. Contam.** 17(9): 763-768, 2000.
20. Teixeira, AR et al. Inventário e Classificação da Ictiofauna do Rio Guaíba. Pesquisa de Metais e Substâncias Tóxicas. **Boletim do DMAE.**, Porto Alegre, n.41, 84p., 1983. Trabalho apresentado no 12º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Balneário Camboriú. 1983.
21. Torgan, L.C.; Becker, V.; Prates, H.M. Checklist das diatomáceas (Bacillariophyceae) de ambientes de águas continentais e costeiras do Estado do Rio Grande do Sul. **Iheringia**, Série Botânica, 52: 89-144, 1999.
22. United States. Departament of Agriculture. **Food Safety and Inspection** {Washington}: Service Analytical Chemistry Laboratory Guidebook.1991. ASN Method 5.010.1991.

Recebido em 16/05/2002 ; Aprovado em 06/08/2003



## Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz

### Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice

Eliane M. R. S. SIMIONATO<sup>1</sup>  
Renato M. ASTRAY<sup>2</sup>  
Célia M. de SYLOS<sup>2\*</sup>

RIALA6/949

SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, C. M. de - Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz  
**Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 123 - 130, 2003.

**RESUMO.** Conhecer as micotoxinas que possam ser encontradas no arroz, alimento básico da população brasileira, é importante para a saúde pública. Aflatoxinas e ocratoxina A foram determinadas pelo método de Soares e Rodriguez-Amaya acrescido de partição para ciclohexano. Os testes de recuperação foram realizados em arroz polido e em arroz integral, artificialmente contaminados com aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), com ocratoxina A (OTA) e, com AFB<sub>1</sub> e OTA juntas. Recuperações entre 93 e 104% e entre 87 a 103% foram obtidas para AFB<sub>1</sub> em arroz polido e em arroz integral, respectivamente. Para a OTA, as recuperações estavam entre 80 e 105% para o arroz polido e entre 83 e 94% para o arroz integral. Os limites de quantificação conseguidos para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foram de 1, 1, 3 e 1 µg/kg para o arroz polido, e de 3, 1, 4 e 3 µg/kg para arroz integral, respectivamente. Para a OTA foi de 4 µg/kg em arroz polido e de 10 µg/kg em arroz integral. Foram analisadas 68 amostras de arroz e não foi encontrada OTA em nenhuma delas. AFB<sub>1</sub> foi detectada em duas amostras de arroz polido tipo 1 (2,9%), com teores de 9 e 6 µg/kg. Uma das amostras apresentou traços de aflatoxina B<sub>2</sub>.

**PALAVRAS-CHAVE.** aflatoxinas, ocratoxina A, arroz, cromatografia em camada delgada, micotoxinas

Endereço para correspondência:

<sup>1</sup>Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde - Universidade do Sagrado Coração - CEP 17044-160 - Bauru - SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Caixa Postal 502 - CEP 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil. syloscm@fcar.unesp.br

## INTRODUÇÃO

Certos fungos, freqüentemente encontrados em grãos, têm a capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários capazes de causar alterações tóxicas, mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas em animais e humanos.

Com vistas ao conhecimento de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são sem dúvida urgentes e necessários.

Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas, metabólitos secundários dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo inclusive propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. As principais aflatoxinas são B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>)<sup>16</sup>.

A toxicidade é maior para aflatoxina B<sub>1</sub>, seguida pelas AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>. A ação tóxica verificada em animais é chamada de carcinoma hepatocelular, a qual é considerada como uma falha do fígado, com destruição das células parenquimatosas e proliferação dos canais biliares. Em humanos a ação tóxica é crônica, e tem sido correlacionada à incidência de câncer de fígado em regiões com alta contaminação por aflatoxinas<sup>9</sup>. Segundo IARC<sup>14</sup>, a aflatoxina B<sub>1</sub> é considerada carcinogênica para o homem.

Muitos alimentos têm apresentado contaminação por aflatoxinas, principalmente amendoim e derivados, milho, arroz, feijão, cevada, nozes e especiarias<sup>2,7,8,9,13,22,25,27,28,30</sup>.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Portaria nº 183 de 21/03/1996, e o Ministério da Saúde, através da Resolução RDC nº 274 da ANVISA de 15/10/2002, estabelecem, em alimentos para consumo humano, o limite de 20 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>.<sup>12</sup>

A ocratoxina A (OTA), micotoxina produzida por *Aspergillus ochraceus* e por *Penicillium verrucosum*, é classificada pelo IARC como um agente possivelmente cancerígeno para o homem<sup>16</sup>. Tem sido correlacionada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (doença caracterizada por progressiva redução das funções renais)<sup>11</sup>, devido ao teor elevado da toxina encontrado no sangue das pessoas que apresentam a doença e nos alimentos consumidos naquela região.

OTA tem sido detectada em vários alimentos, dentre eles alguns que fazem parte do consumo alimentar diário do brasileiro, como arroz, feijão, café, milho e trigo<sup>13,28,29,32,33</sup>.

O arroz (*Oryza sativa* L.), juntamente com o milho, é o segundo cereal mais produzido no mundo, estando atrás apenas do trigo. O Brasil é um dos poucos países não asiáticos no qual o arroz é cultivado e utilizado como gênero básico de consumo alimentar, ocupando o décimo lugar em consumo mundial de arroz<sup>26</sup>.

Embora a presença de fungos produtores de micotoxinas em arroz tenha sido verificada por diversos pesquisadores<sup>6,21,31</sup>,

levantamentos realizados mostraram a baixa ocorrência de micotoxinas.

A ocorrência de micotoxinas em arroz vem sendo relatada pelos pesquisadores de vários países<sup>1,7,8,10,19,20,22,23,29,30</sup>. No Brasil, os relatos sobre ocorrência de aflatoxinas e OTA em arroz são poucos e os níveis e a incidência são baixos<sup>2,13,28</sup>.

O objetivo deste trabalho foi adaptar a metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya<sup>28</sup> para a determinação de aflatoxinas e ocratoxina A, simultaneamente, em arroz polido e arroz integral e verificar a ocorrência destas micotoxinas em amostras comerciais de arroz da região de Araraquara.

## MATERIAL e MÉTODO

### Material

As amostras de arroz foram obtidas em supermercados, mercados e armazéns do município de Araraquara, Estado de São Paulo. Foram coletadas cerca de 200g de arroz provenientes de unidades comerciais de 5 ou 2 kg, estas foram homogeneizadas, moídas em liquidificador e passadas por uma peneira de 20 mesh. As amostras moídas foram armazenadas para posterior contaminação com soluções padrão das micotoxinas.

Foram analisadas 60 amostras de arroz polido (31 do tipo 1, 16 de tipo 2, 11 do tipo 1 parboilizado, uma de tipo 2 parboilizado e uma de cateto) e 8 amostras de arroz integral (uma do tipo 1, uma de tipo 2, cinco de parboilizado e uma de cateto).

As análises para determinação de aflatoxinas e ocratoxina A foram realizadas em duplicata.

### Método

Inicialmente, o método a ser utilizado<sup>28</sup> foi avaliado quanto à limpeza do extrato, taxas de recuperação para as micotoxinas e estabelecido os limites de detecção e de quantificação para amostras de arroz polido e de arroz integral.

O método por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de Soares e Rodriguez-Amaya<sup>28</sup> consiste na extração das toxinas com metanol-KCl 4% (9:1), remoção de interferentes com solução de sulfato de amônio 30% e partição para clorofórmio. As micotoxinas foram quantificadas por comparação visual da intensidade da fluorescência das amostras com padrões sob iluminação UV a 365 nm.

A avaliação e o estudo da recuperação do método foram realizados com amostras de arroz do tipo 1 e de integral. Elas foram contaminadas artificialmente com AFB<sub>1</sub>, com OTA, com AFB<sub>1</sub> + OTA e com AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>. Cada ensaio foi realizado em dois ou três níveis de contaminação com seis repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Adequação da metodologia

O uso da solução de sulfato de amônio 30% para limpeza das amostras foi mais efetivo que a solução de sulfato de cobre

a 10%, embora este último seja proposto por Soares e Rodriguez-Amaya<sup>28</sup> para amostras de arroz.

Para separação das micotoxinas em camada delgada de sílica gel foi avaliado três misturas de solventes: tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (6:4:0,5); benzeno-metanol-ácido acético (18:1:1) e tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1), sendo esta última àquela que conseguiu separar a OTA e as quatro aflatoxinas simultaneamente. Entretanto, foi verificado à presença de interferentes próximos a mancha do padrão de OTA, dificultando sua visualização e quantificação. Para as aflatoxinas tal problema não ocorreu.

Utilizando o método de Soares e Rodriguez-Amaya<sup>28</sup> o limite de quantificação conseguido para ocratoxina A, para os dois tipos de arroz, foi de 13µg/kg, valor maior que o citado pelos autores.

Soares e Rodriguez-Amaya<sup>28</sup> obtiveram para ocratoxina A, em amostras de milho, farinha de mandioca, arroz e feijão, um limite de detecção de 5 µg/kg e um limite de quantificação de 10 µg/kg. Os autores definem limite de quantificação como sendo a menor concentração que pode ser confirmada e quantificada com reprodutibilidade e limite de detecção como o menor teor de um composto que pode ser detectada, mas não quantificada.

A legislação brasileira não estabelece limites máximos permitidos para OTA em alimentos, entretanto, os limites estabelecidos por outros países como França, EUA e Dinamarca para cereais estão na faixa de 5 µg/kg<sup>12</sup>, valor menor que o limite por nós conseguido. Com o objetivo de eliminar os interferentes que eluíam junto com a OTA, e baixar o limite de quantificação, foram testados alguns procedimentos em amostras artificialmente contaminadas com OTA e AFB<sub>1</sub>.

A inclusão da etapa de desengorduramento antes da partição para clorofórmio foi testada com hexano e ciclohexano. O uso do ciclohexano (100ml) foi melhor, proporcionou um extrato mais limpo sem “strecking” para amostras de arroz polido. Já para o arroz integral ainda se observava o “strecking” nas placas, embora de menor intensidade.

Uma vez que colunas de extração em fase sólida têm sido utilizadas por alguns pesquisadores para a limpeza dos extratos na análise de micotoxinas<sup>4,5,17,18</sup>, testou-se a limpeza em coluna de sílica para amostras de arroz polido e integral. As etapas de extração, limpeza com solução de sulfato de amônia e partição para clorofórmio foram mantidas. O extrato de clorofórmio seco

foi redissolvido com duas alíquotas de 0,5 mL de tolueno e transferido quantitativamente para o cartucho de sílica (WATERS), previamente condicionado com 10 mL de tolueno. Após lavagem da amostra com 10 mL de tolueno, a ocratoxina A foi eluída com 10 mL de tolueno-ácido acético (9:1). Os extratos obtidos das amostras de arroz integral apresentavam-se com menos interferentes quando aplicados na CCD, entretanto, não foi possível eluir da coluna a AFB<sub>1</sub>. Como nosso objetivo era utilizar um método com extração simultânea de aflatoxinas e OTA em arroz, tal procedimento foi descartado.

Outra tentativa foi melhorar a separação das micotoxinas dos interferentes na própria camada delgada de sílica gel. Após a aplicação do extrato, a placa era desenvolvida com outros solventes antes da separação das micotoxinas. Foram testados os procedimentos descritos por Di Paolo e Tosi<sup>5</sup> e por Dawlatana et al<sup>4</sup>. As misturas avaliadas foram éter etílico-éter de petróleo (3:1) e éter etílico-metanol (98:2), antes do desenvolvimento com a fase móvel tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1).

Após a aplicação das amostras e padrões (a 4 cm da base), a placa foi colocada de cabeça para baixo e desenvolvida com éter etílico-éter de petróleo (3:1). As micotoxinas permaneciam no ponto de aplicação enquanto os interferentes corriam com a fase móvel. Em seguida era cortado cerca de 3 cm da ponta superior da placa de alumínio (onde estavam os interferentes), e esta era invertida e desenvolvida com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1) para a separação das micotoxinas. O mesmo procedimento foi realizado substituindo a mistura etílica por éter etílico-metanol (98:2). A mistura éter etílico-éter de petróleo (3:1) foi mais eficiente na limpeza das amostras do que éter etílico-metanol (98:2) na remoção de interferentes, permitindo uma boa visualização das manchas após a separação das micotoxinas na placa.

Para cada procedimento de limpeza testado foi determinado o limite de quantificação para OTA. Pelos resultados apresentados (Tabela 1) verificamos que a inclusão da etapa de desengorduramento com ciclohexano foi efetiva em amostras de arroz polido, diminuindo o limite de quantificação para 4 µg/kg. Já para o arroz integral, o uso de coluna de sílica para limpeza conseguiu baixar o valor para 7 µg/kg, entretanto este procedimento não permite quantificar as aflatoxinas simultaneamente. Com os demais procedimentos o resultado foi de 10 µg/kg.

**Tabela 1.** Limites de quantificação obtidos para ocratoxina A com os diferentes procedimentos de limpeza.

Procedimentos	Arroz polido (µg/kg)	Arroz integral (µg/kg)
Método SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA <sup>28</sup>	13	13
Método <sup>28</sup> + desengorduramento com hexano	10	10
Método <sup>28</sup> + desengorduramento com ciclohexano	4	10
Método <sup>28</sup> + limpeza em coluna sílica	7	7
Método <sup>28</sup> + limpeza em CCD de sílica	8	10



**Tabela 2.** Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) obtido pelo método proposto, em µg/kg, para as aflatoxinas e ocratoxina A.

	Arroz polido		Arroz integral	
	LD	LQ	LD	LQ
Aflatoxina B <sub>1</sub>	-*	1	2	3
Aflatoxina B <sub>2</sub>	-*	1	-*	1
Aflatoxina G <sub>1</sub>	2	3	4	4
Aflatoxina G <sub>2</sub>	-*	1	2	3
Ocratoxina A	3	4	9	10

\* não foi determinado o limite de detecção.

Portanto a metodologia empregada foi extração das micotoxinas com metanol: KCl 4% (9:1, v/v), limpeza com sulfato de amônia 40%, desengorduramento com ciclohexano, partição para clorofórmio. A fase móvel usada para CCD de sílica foi tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1).

Amostras de arroz polido e de arroz integral foram contaminadas com teores decrescentes de cada aflatoxina, iniciando-se com 5 µg/kg, e analisadas pelo método estabelecido. Foi considerado como limite de quantificação, a menor concentração que pudesse ser quantificada com segurança, e como limite de detecção, a concentração que indicasse que havia a presença da toxina, embora não fosse possível quantificá-la.

Os limites de quantificação encontrados para aflatoxinas em arroz polido foram 1 µg/kg para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> e 3 µg/kg para AFG<sub>1</sub> e, em arroz integral, 1 µg/kg para AFB<sub>2</sub>, 3 µg/kg para AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> e 4 µg/kg para AFG<sub>1</sub> (Tabela 2).

#### Recuperação do método proposto

A determinação das taxas de recuperação da metodologia proposta foi realizada com amostras de arroz

polido foram artificialmente contaminadas com AFB<sub>1</sub> (3, 10, 20 e 30 µg/kg), com OTA (7, 15, 20 e 30 µg/kg), com AFB<sub>1</sub> + OTA (30 + 30, 15 + 30, 30 + 15 µg/kg) e com as quatro aflatoxinas (10, 20 e 30 µg/kg da cada uma). As amostras de arroz integral foram artificialmente contaminadas com AFB<sub>1</sub> (6, 10, 20 e 30 µg/kg), com OTA (13, 15, 20 e 30 µg/kg), com AFB<sub>1</sub> + OTA (30 + 30, 15 + 30, 30 + 15 µg/kg) e com as quatro aflatoxinas (10, 20 e 30 µg/kg da cada uma).

Para AFB<sub>1</sub> foram obtidos taxas médias de recuperação de 93 a 104% e de 87 a 103% para arroz polido e integral, respectivamente. Em relação a OTA, os valores encontrados foram de 80 a 105% para arroz polido e de 83 a 94% para arroz integral (Tabela 3).

Segundo Rodriguez-Amaya<sup>24</sup>, deve ser reconhecido que o analito adicionado a um substrato não se comporta da mesma maneira que o endógeno. Recuperações de 70 a 120% são aceitas em análises de traços (µg/kg), como é o caso da determinação de micotoxinas. Portanto, os valores obtidos das recuperações podem ser considerados bons, com coeficientes de variação dentro do esperado, tanto para aflatoxina B<sub>1</sub> e como para ocratoxina A (Tabela 3).

**Tabela 3.** Taxas de recuperação de aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A em arroz.

Produto	Aflatoxina B <sub>1</sub>			Ocratoxina A		
	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)*	CV (%)	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)*	CV (%)
Arroz polido	3	93,3	0	7	79,8	1,5
Arroz polido	10	103,0	0	15	95,2	18
Arroz polido	20	104,1	13	20	87,4	12
Arroz polido	30	100,9	0,2	30	104,6	8
Arroz integral	6	86,7	0	13	83,1	3,3
Arroz integral	10	102,9	0	15	91,0	0
Arroz integral	20	98,3	11	20	93,6	4
Arroz integral	30	101,4	5	30	90,2	10

\* valor médio de 6 determinações

**Tabela 4.** Taxas de recuperação de aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A em arroz contaminado simultaneamente com as duas micotoxinas.

Produto	Aflatoxina B <sub>1</sub>			Ocratoxina A		
	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)
Arroz polido	30	114,3	0	30	89,2	29,2
Arroz polido	15	116,7	22,2	30	106,0	11,7
Arroz polido	30	102,9	18,6	15	90,9	0
Arroz integral	30	81,4	0	30	75,8	15,7
Arroz integral	15	96,1	3	30	108,2	0
Arroz integral	30	114,0	0	15	101,0	15,5

\* valor médio de 6 determinações

A seguir estão apresentadas as taxas de recuperação obtidas para ocratoxina A e para aflatoxina B<sub>1</sub> juntas na mesma amostra (Tabelas 4).

Embora as taxas de recuperação sejam satisfatórias, um elevado coeficiente de variação foi obtido para a aflatoxina B<sub>1</sub> na presença da ocratoxina A, tanto para arroz polido quanto para o integral, em todos os níveis de contaminação estudados.

No caso da recuperação das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> juntas, tanto para o arroz polido quanto para o integral, as

porcentagens de recuperação foram menores do que aquelas obtidas para a aflatoxina B<sub>1</sub> sozinha (Tabela 3), principalmente no nível de contaminação de 10 µg/kg. Para o arroz polido, estas taxas de recuperação podem ser também consideradas satisfatórias, sendo a menor de 74,9% (para AFG<sub>1</sub> a 10 µg/kg), mas os coeficientes de variação foram bastante elevados, chegando a 50,0% (AFB<sub>2</sub> 10 µg/kg) (Tabela 5). Os dados obtidos para amostras de arroz integral mostraram taxas de recuperação de 61,1% para B<sub>2</sub> (10 µg/kg) e coeficiente de variação de 22,5% (Tabela 5).

**Tabela 5.** Taxas de recuperação de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em arroz.

Aflatoxinas	Arroz Polido			Arroz Integral		
	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)
AFB <sub>1</sub>	10	90,3	23,9	10	76,1	17,6
AFB <sub>2</sub>	10	84,5	50,0	10	61,1	10,7
AFG <sub>1</sub>	10	74,9	29,4	10	72,6	22,5
AFG <sub>2</sub>	10	83,8	28,8	10	72,7	16,7
AFB <sub>1</sub>	20	108,1	20,0	20	88,0	3,8
AFB <sub>2</sub>	20	85,3	11,5	20	86,8	16,6
AFG <sub>1</sub>	20	92,9	10,0	20	89,6	0
AFG <sub>2</sub>	20	86,7	0	20	91,6	11,8
AFB <sub>1</sub>	30	93,9	8,7	30	98,6	7,7
AFB <sub>2</sub>	30	87,5	5,1	30	97,8	8,9
AFG <sub>1</sub>	30	84,4	16,0	30	101,2	4,6
AFG <sub>2</sub>	30	90,8	16,0	30	97,1	0,3

\* valor médio de 6 determinações

### **Ocorrência de Aflatoxinas e Ocratoxina A**

Cada uma das 68 amostras de arroz foi analisada em duplicata segundo a metodologia estabelecida. Do total de amostras 70,6% eram de amostras arroz polido, 17,6% de arroz parboilizado e 11,8% de arroz integral. Duas amostras (2,9% do total) apresentaram contaminação por aflatoxinas. Uma apresentou 9 µg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub> e traços de aflatoxina B<sub>2</sub> e a outra apresentou 6 µg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub>. As amostras contaminadas eram de arroz polido, tipo 1, longo fino. Não foi verificada a presença de ocratoxina A em nenhuma das amostras analisadas.

Outros trabalhos também mostraram a pouca ocorrência e os baixos níveis de contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A em amostras de arroz<sup>17,28</sup>. O mesmo vem sendo constatado por pesquisadores brasileiros<sup>3,12,15,26</sup>.

### **CONCLUSÕES**

A metodologia empregada foi considerada adequada, tendo apresentado boa recuperação e limites de detecção satisfatórios para amostras artificialmente contaminadas com as micotoxinas, isoladamente. A adição da etapa de desengorduramento com ciclohexano foi necessária para diminuição do limite de quantificação da ocratoxina A.

A ocorrência de aflatoxinas foi muito pequena nas amostras de arroz analisadas. De um total de 68 amostras apenas duas continham aflatoxinas B<sub>1</sub> (6 e 9 µg/kg) e traços de aflatoxina B<sub>2</sub>. Não foi verificada a ocorrência de ocratoxina A em nenhuma das amostras analisadas.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao PADC/FCF – UNESP, pelo apoio financeiro, e a FAPESP, pela bolsa de Iniciação Científica do segundo autor.

SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, C. M. de - Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice.  
**Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 123 - 130, 2003.

**ABSTRACT.** Rice is a basic food for Brazilian people and thus, it is very important to have information about the occurrence of mycotoxins in this cereal. Aflatoxins and ochratoxin A were determined at the method of Soares and Rodriguez-Amaya (1989) added of cyclohexane partition in the cleaning of the extract. The recovery tests were carried out in samples of polished rice and brown rice artificially contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), with ochratoxin A (OTA) and with AFB<sub>1</sub> together. Recovery obtained for AFB<sub>1</sub>, varied from 94 to 104% for polished rice and 87 to 103% for brown rice. For OTA the recovery found were between 80 and 105% for polished rice and 83 to 94% for brown rice. The quantification limits were also evaluated and for the aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> were 1, 1, 3 and 1 µg/kg for the polished rice and 3, 1, 4 and 3 µg/kg for brown rice, respectively. The quantification limit of the method for OTA was 4 µg/kg for polished rice and 10 µg/kg for brown rice. Sixty-eight rice samples were analyzed. OTA was not found in any of the analyzed samples. AFB<sub>1</sub> was detected in two polished rice samples: type 1 with 9 and 6 µg/kg and aflatoxin B<sub>2</sub> traces was found in one sample.

**KEY-WORDS.** aflatoxins, ochratoxin A, rice, thin layer chromatography, mycotoxins.

#### REFERÊNCIAS

1. Abd Alla, E.S.A.M. Zearalenona: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. **Nahrung**, 41(6): 362-5, 1997.
2. Caldas, E.D., et al. Contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A nos alimentos consumidos no distrito federal. **Rev. Saúde Distrito Federal**, 9(2): 44-7, 1998.
3. Coelho, C.S.P. **Migração de micotoxinas durante o processo de parboilização do arroz**. Rio Grande, 1998. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade do Rio Grande].
4. Dawlatana M., et al. Normal phase HPTLC method for the quantitative determination of ochratoxin A in rice. **Chromatographia**, 42(1/2): 25-8, 1996.
5. Di Paolo, O.; Tosi, E.A. Contaminación de harina de maíz con ocratoxina A, aflatoxinas y zearalenona. **Alimentaria**, 291: 67-9, 1998.
6. Desjardins, A. E., Plattner, R.D., Nelson, P.E. Production of fumonisin B<sub>1</sub> and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63(5): 1838-42, 1997.
7. Dhavan, A.S., Choudary, M.R. Incidence of aflatoxins in animal feedstuffs: a decade's scenario in India. **J. AOAC Int.**, 78(3): 693-8, 1995.
8. El-Gohary, A.H. Aflatoxin in some foodstuffs with reference to public health hazard in Egypt. **Indian J. Animal Sci.**, 66(5): 468-73, 1996.
9. Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Rev. Food Sc. Nutrition**, 30(3): 403-39, 1991.
10. El-Maghraby, O.M.O. Mycotoxins and mycoflora of rice in Egypt with special reference to trichothecenes production and control. **J. Natural Toxins**, 5 (1): 49-59, 1996.
11. Fink-Gremmels, J., Jahn, A., Blom, M.J. Toxicity and metabolism of ochratoxin A. **Nat. Toxins**, 3: 214-20, 1995.
12. Fonseca, H. Micotoxinas - Legislação. [<http://www.micotoxinas.com.br>]. 30 maio 2003.
13. Furlong, E.B., et al. Aflatoxinas, ocratoxina a e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(2): 105-11, 1999.
14. IARC. Overall Evaluation of Carcinogenicity to Humans. **International Agency for Research on Cancer**. [<http://www.iarc.fr>]. 02 junho 2003.
15. Lima, C.A.P.; et al. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, 20(1): 37-9, 2000.
16. Marth, E.H. Mycotoxins: production and control. **Food Laboratory News**, 8(3): 35-51, 1992.
17. Milanez, T.V.; Sabino, M. Ocratoxina A em feijão comercializado no estado de São Paulo e sua estabilidade ao cozimento. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 49(1): 131-5, 1989.
18. Milanez, T.V., Sabino, M., Lamardo, L.C.A. Comparison of two methods for the determination of ochratoxin A in green coffee beans. **Rev. Microbiol.**, 26(2): 79-82, 1995.
19. Patel, S., et al. Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Addit. Contam.**, 13(7): 833-41, 1996.
20. Patel, S., et al. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Addit. Contam.**, 14(3): 217-22, 1997.
21. Pitt, J.I., et al. The normal mycoflora of commodities from Thailand. **Food Microbiol.**, 23: 35-53, 1994.
22. Purwoko, H.M., Hald, B., Wolstrup, J. Aflatoxin content and number of fungi in poultry feedstuffs from Indonesia. **Letters**

- Appl. Microbiol.**, 16(2): 212-5, 1991.
23. Resnik, S., Costarrica, M.L., Pacin, A. Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. **Food Control**, 6(1): 19-28, 1995.
24. Rodriguez-Amaya, D.B. Metodologia - Validação de metodologia analítica. In: SCUSSEL, V.M. **Atualidade em micotoxinas e armazenagem de grãos**. 1ª.ed., Florianópolis: 2000. p.42-7.
25. Sabino, M., et al. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.**, 30(1): 85-8, 1999.
26. SINDARROZ. O arroz. [<http://www.sindarroz-sc.com.br>]. 02 junho 2003.
27. Soares, L.M., Rodriguez-Amaya, D.B. Screening and quantification of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 68(6): 1128-30, 1985.
28. Soares, L.M., Rodriguez-Amaya, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72(1): 1-5, 1989.
29. Studer-Rohr, I., et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chem. Toxicol.**, 33(5): 341-55, 1995.
30. Tabata, S., et al. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokio: 1986-1990. **J. AOAC. Int.**, 76(1): 32-5, 1993.
31. Tonon, S.A., et al. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. **Int. J. Food Microbiol.**, 37(2/3): 231-5, 1997.
32. Trucksess, M.W., et al. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee - 1997. **JAOAC Int.**, 82(1): 85-9, 1999.
33. Van Egmond, H.P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Addit. Contam.**, 13(S): 11-3, 1996.

Recebido em 21/03/2003 ; Aprovado em 07/08/2003

## Ácidos graxos saturados *versus* ácidos graxos *trans* em biscoitos.

### Saturated fatty acids *versus trans* fatty acids in cookies.

Sabria AUED-PIMENTEL<sup>1\*</sup>  
Miriam S. F. CARUSO<sup>1</sup>  
José M. M. CRUZ<sup>2</sup>  
Edna E. KUMAGAI<sup>1</sup>  
Daniela U. O. CORRÊA<sup>1</sup>

RIALA6/950

Aued-Pimentel, S. et al. Ácidos graxos saturados *versus* ácidos graxos *trans* em biscoitos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 131 - 137, 2003.

**RESUMO.** A ingestão de ácidos graxos saturados pode trazer riscos à saúde. Evidências científicas mostram que a ingestão de ácidos graxos *trans* produz efeito similar aos ácidos saturados, entretanto, a legislação brasileira atual exige apenas a declaração do teor dos ácidos saturados na rotulagem dos alimentos embalados. Diversos alimentos são elaborados empregando gordura vegetal hidrogenada rica em ácidos graxos *trans*, como por exemplo os biscoitos, consumidos principalmente por crianças e adolescentes. O objetivo deste trabalho foi comparar os teores de ácidos graxos saturados e de ácidos graxos *trans* em amostras de biscoitos, e fornecer subsídios que auxiliem as autoridades brasileiras na elaboração de novas legislações. Foram analisadas 26 amostras de biscoitos de 6 marcas e 4 tipos diferentes: recheados, wafer, salgados diversos e doces diversos. A composição de ácidos graxos da gordura extraída dos biscoitos (Soxhlet) foi determinada por cromatografia em fase gasosa. Os teores dos ácidos saturados e *trans* foram similares na maioria das amostras, representando porcentagem considerável do conteúdo de lipídios. Os resultados obtidos trazem subsídios para a reformulação da legislação em vigor, exigindo a declaração de ácidos graxos *trans* na rotulagem de biscoitos, e de outros produtos com altos teores destes ácidos, face às implicações à saúde humana.

**PALAVRAS-CHAVE.** ácidos graxos; ácidos graxos *trans*; biscoitos; legislação brasileira.

Endereço para correspondência:

\*<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Laboratório de Cromatografia  
Av Dr Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo – SP, e-mail: spimente@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Doces, Farinhas e Amiláceos

## INTRODUÇÃO.

Os óleos e gorduras são componentes essenciais para a dieta humana. Desempenham diferentes papéis no organismo humano, isto é, como reserva de energia, de fosfolipídios e de esteróis; contêm ácidos graxos essenciais, que não são produzidos pelos mamíferos, mas precisam estar presentes na dieta; auxiliam no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E, e K, pelo intestino, bem como, conferem sabor ao alimento<sup>9</sup>. As gorduras, tanto de origem animal como vegetal, são constituídas por ácidos graxos saturados e insaturados (mono e polinsaturados)<sup>35</sup>.

Diversos estudos, realizados tanto em animais de experimentação como em seres humanos, têm demonstrado que a presença na dieta de ácidos graxos saturados aumenta os níveis de colesterol plasmático. Este efeito varia segundo o tamanho da cadeia de ácido graxo, quantidade de colesterol da dieta e níveis prévios de colesterol plasmático<sup>10,19,35,29</sup>. A maioria dos ácidos graxos insaturados ocorre na natureza na configuração geométrica *cis*; as enzimas envolvidas na síntese dos ácidos graxos são seletivas para esta configuração. A alteração da estrutura dos ácidos graxos para a forma *trans* pode afetar vários processos fisiológicos, influenciando na função e metabolismo dos ácidos graxos, como por exemplo, na sua incorporação nos fosfolipídios e sua transformação em prostaglandinas e outros eicosanóides<sup>32,35,37</sup>. A introdução dos ácidos graxos *trans* em quantidades consideráveis na dieta humana iniciou-se com a utilização do processo de hidrogenação das gorduras. A hidrogenação parcial dos óleos vegetais polinsaturados, catalisada principalmente por Ni, produz isomerização de algumas duplas ligações e migração de outras resultando num aumento dos ácidos graxos *trans* e gerando gorduras com ponto de fusão mais alto, maiores plasticidade e estabilidade oxidativa que os óleos originais<sup>17,25</sup>. Os ácidos graxos *trans* apresentam pelo menos uma dupla ligação na configuração *trans* e estão presentes naturalmente, em pequenas quantidades, na gordura do leite e em outras gorduras de origem vegetal e animal<sup>32,35</sup>. Entretanto, as gorduras parcialmente hidrogenadas são as maiores fontes destes ácidos, sendo encontradas em um grande número de alimentos processados como margarinas e produtos de panificação<sup>16</sup>.

A configuração molecular mais estendida dos ácidos graxos *trans* confere maior similaridade de estrutura com a dos ácidos graxos saturados do que com os isômeros insaturados na forma *cis*. Os ácidos graxos *trans* têm sido correlacionados com a etiologia de várias disfunções metabólicas, como por exemplo a inibição do metabolismo de ácidos graxos essenciais influenciando o desenvolvimentos infantil<sup>30</sup>. Entretanto, o principal efeito à saúde está relacionado ao aumento das LDL-colesterol no plasma, de forma semelhante aos ácidos graxos saturados, e, portanto, ao aumento do risco das doenças cardiovasculares<sup>5,6,7,28,31,33</sup>. Em termos nutricionais, maior atenção tem sido dada à ingestão dos ácidos graxos saturados,

entretanto, estudos demonstram que a ingestão de altos níveis de ácidos graxos *trans* promove um aumento mais significativo na razão LDL/HDL-colesterol do que a ingestão de ácidos graxos saturados, e, conseqüentemente, um efeito adverso à saúde mais acentuado<sup>7</sup>.

Os ácidos graxos *trans* são absorvidos e transportados de maneira semelhante aos outros ácidos graxos da dieta<sup>17,35,36</sup>. Estudos em animais e em humanos indicam que os teores de ácidos graxos *trans* no tecido adiposo refletem o conteúdo destes ácidos na alimentação<sup>21,36</sup>. Seppanen-Laakso et al demonstraram que os ácidos graxos eláidico e *trans*-vacênico (C18:1 *n*-9 e *n*-7) são rapidamente incorporados nos fosfolipídios do plasma e são bons indicadores do aumento ou diminuição dos ácidos graxos *trans* com a substituição das gorduras na dieta<sup>36</sup>.

Nos países do ocidente, a gordura consumida diariamente corresponde de 35 a 45 % da energia total da dieta (77-97g/dia) sendo que os ácidos graxos saturados contribuem com cerca de 13,0 % (28,0 g/dia) e os *trans* entre 1,0– 2,5 % (2,2 a 5,4 g/dia) desta energia<sup>1,16,26</sup>.

Diversos produtos alimentícios são elaborados empregando como ingrediente gordura vegetal hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*; como exemplo, os biscoitos, consumidos principalmente por crianças e adolescentes<sup>23</sup>.

O Código de Defesa do Consumidor brasileiro, no seu artigo 31, determina que os produtos ofertados à população devem apresentar declarações corretas e objetivas a respeito de suas características quanto à qualidade, quantidade, composição, entre outras, além dos riscos que oferecem à saúde dos consumidores<sup>11</sup>. A informação precisa sobre o conteúdo dos nutrientes, entre eles, os ácidos graxos saturados e os ácidos graxos *trans* nos alimentos possibilita ao consumidor a escolha de uma alimentação mais saudável. A Resolução RDC 40/01 da ANVISA/MS que trata da Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados, define gordura saturada como sendo os ácidos graxos sem duplas ligações. Esta exige que sejam declarados no rótulo os teores de ácidos graxos saturados, entretanto, não obriga a declaração dos teores de ácidos graxos *trans*, uma vez que estes nem são citados nesta Resolução<sup>13</sup>. Paralelamente, a Portaria nº 27/98, da ANVISA/MS, a qual dispõe sobre a informação Nutricional Complementar, determina que os ácidos graxos *trans* devem ser computados no cálculo de gorduras saturadas (quando aplicável); porém, esta Portaria é de caráter opcional, ficando a critério das empresas a declaração ou não desta informação<sup>12</sup>.

O presente trabalho tem como objetivo comparar os teores de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* em algumas amostras de biscoitos, e fornecer subsídios que auxiliem as autoridades brasileiras na elaboração de novas legislações que exijam a declaração dos teores de ácidos graxos *trans* nas embalagens de produtos alimentícios, onde estes sejam significativos e possam comprometer a saúde dos consumidores.

## MATERIALE MÉTODOS

### 1. Material

Vinte e seis amostras de biscoitos de seis fabricantes e quatro tipos diferentes foram analisadas, sendo: dez biscoitos recheados, quatro tipo wafer, sete salgados diversos (água e sal, cream cracker, com fibras e gergelim, salgado tradicional e com cereais) e cinco doces diversos (tipo Maria, sabor chocolate, amanteigado sabor banana e canela e amanteigado sabor leite). As amostras foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análises de orientação e controle visando adequação da rotulagem.

### 2. Métodos

A gordura das amostras de biscoitos foi extraída pelo método de Soxhlet<sup>34</sup>. Os ácidos graxos dos óleos foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos, seguindo, em linhas gerais, a metodologia IUPAC 2301<sup>27</sup>. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso marca Shimadzu, modelo GC-17A com detector de ionização de chama<sup>2,3,4</sup>. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme 0,20 µm. Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada da coluna 60 °C (2min), 15 °C/min até 135 °C (1 min); 3 °C/min até 215 °C (5 min); temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do detector: 220 °C; gás de arraste: hidrogênio, velocidade linear 22 mL/min; razão de divisão da amostra 1:50. Os ácidos graxos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção de padrões puros de metil ésteres de ácidos graxos com os componentes separados das amostras. A quantificação foi feita por normalização de área e a soma das porcentagens multiplicadas pelos teores de lipídios e fator de conversão de Holland<sup>24</sup>. Este fator é empregado para converter a gordura em ácidos graxos. O fator empregado no trabalho foi 0,956, pois a gordura obtida dos biscoitos provém de óleos vegetais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os teores de lipídios, ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* da gordura das amostras de biscoitos analisadas. Na grande maioria das amostras (biscoitos salgados, doces e recheados) os teores de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* foram similares, independente de fabricantes ou marcas, como é ilustrado na Figura 1. Todavia, para as amostras do tipo wafer o teor de ácidos graxos saturados foi bem superior ao da totalidade das amostras (faixa de variação: 7,3 – 14,9%).

O valor médio obtido para os teores de ácidos graxos *trans* nesta categoria de alimento foi de  $3 \pm 1$  g/100g da amostra, enquanto que o de ácidos saturados foi de  $6 \pm 3$  g/100g da amostra. Os ácidos graxos *trans* predominantes foram do ácido octadecenoico (C18:1), cujos os valores médios coincidem com as médias do total de ácidos *trans* encontrados nos biscoitos ( $3 \pm 1$  g/100g da amostra). Estes isômeros *trans* são também os

predominantes nas gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas, inclusive nas comercializadas no Brasil<sup>8,15</sup>. Através de uma análise prévia por cromatografia em camada delgada com íon prata ou por cromatografia líquida de alta eficiência é possível fracionar os diversos isômeros do ácido octadecenoico, entre eles os *trans*<sup>36,38</sup>. No presente trabalho não foi feito o isolamento prévio, pois estes isômeros *trans* eluíram juntos, e estão representados no cromatograma da Figura 2 pelo pico que antecede o do ácido oléico. O valor da somatória dos isômeros é a informação necessária para atender ao objetivo do trabalho.

Badolato<sup>8</sup>, em um estudo sobre os ácidos graxos *trans*, analisou 19 amostras de gorduras vegetais hidrogenadas e 14 de margarinas comercializadas no Brasil, além de 16 margarinas importadas; foi verificada uma variação entre 7,3 a 40,1 % de isômeros *trans* do ácido octadecenoico (C18:1) nas gorduras hidrogenadas e de 0 a 16,1 % nas margarinas comercializadas no Brasil, sendo que estes resultados foram obtidos na análise das amostras em coluna CP-Sil 88, de 60 m, similar à empregada no presente trabalho. Outros ácidos graxos *trans* foram encontrados em menor porcentagem. Quatro margarinas comercializadas no Brasil apresentaram baixo teor de ácidos graxos *trans* e uma não continha estes ácidos. Badolato avaliou este resultado como sendo uma sinalização de que algumas indústrias brasileiras têm adotado processos tecnológicos para minimizar a formação dos ácidos graxos *trans*. Somente duas amostras de margarinas importadas apresentaram ácidos graxos *trans*, e em pequenas quantidades.

Nos últimos anos, na Europa e nos Estados Unidos, os níveis de ácidos graxos *trans* têm sido reduzidos nas dietas, através de medidas tecnológicas adequadas, que levam em consideração as recomendações de diversas autoridades governamentais. A FDA, agência responsável pela proteção e promoção da saúde nos Estados Unidos (Food and Drug Administration), vem discutido há vários anos a regulamentação da rotulagem nutricional dos alimentos quanto aos ácidos graxos *trans*. Em 1999 foi proposto que se expressasse na rotulagem a quantidade de ácidos graxos *trans* e a porcentagem do Valor Diário de Referência (VDR) juntamente com a dos ácidos graxos saturados. Entretanto, a partir desta proposta o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências (IOM/NAS) dos Estados Unidos elaborou um relatório detalhado sobre os ácidos graxos *trans*, o qual reforça as evidências da correlação positiva entre a ingestão dos ácidos graxos *trans* e as doenças cardiovasculares. Este documento também sugere um limite de ingestão tolerável de zero para os ácidos graxos *trans*, o qual é impraticável uma vez que estes estão presentes naturalmente nas dietas. Desta forma, o relatório recomenda que o consumo daqueles ácidos seja o menor possível numa dieta nutricional adequada. Considerando as informações e conclusões deste relatório, a FDA pretende publicar em 2003 uma resolução exigindo a declaração do conteúdo dos ácidos graxos *trans* no quadro da informação nutricional, logo abaixo da declaração da gordura saturada, similar às gorduras mono e



**Tabela 1.** Composição de lipídios, ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* em amostras de biscoitos.

Ano	Tipo	Lipídios (g/100g)	Saturadas (g/100g)	Σ <i>Trans</i> isômeros (g/100g)	C18:1T (g/100g)	(C18:2T + C18:3T) (g/100g)	(Sat + <i>Trans</i> ) (g/100g)
2001	Biscoito Água e Sal	12,49	2,82	3,02	2,70	0,32	5,84
2001	Biscoito cream cracker	9,40	2,16	2,56	2,29	0,27	4,72
2002	Biscoito cream cracker	17,08	4,21	2,53	2,32	0,21	6,74
2001	Biscoito salgado com fibras e gergelim	11,66	2,32	2,06	1,63	0,43	4,38
2002	Biscoito salgado	11,33	3,18	1,79	1,42	0,37	4,97
2001	Biscoito salgado tradicional	18,36	3,77	4,40	3,53	0,87	8,17
2001	Biscoito salgado com cereais	18,61	4,18	4,28	3,74	0,54	8,46
2001	Wafer sabor chocolate com recheio sabor coco	27,86	14,93	3,40	3,26	0,14	18,33
2001	Wafer sabor chocolate com recheio sabor chocolate branco	26,07	10,19	4,48	4,29	0,19	14,67
2001	Wafer com recheio sabor morango	26,78	7,30	0,55	5,31	2,13	7,85
2001	Wafer sabor chocolate com recheio sabor chocolate branco	26,90	10,08	0,17	4,61	0,68	10,25
2001	Biscoito recheado sabor chocolate	18,33	4,07	3,95	3,72	0,23	8,02
2001	Biscoito recheado sabor morango	19,00	4,22	4,09	3,85	0,24	8,31
2001	Biscoito recheado sabor chocolate branco	16,67	3,83	4,60	4,27	0,33	8,43
2002	Biscoito recheado sabor chocolate	16,96	4,57	4,14	3,41	0,73	8,71
2002	Biscoito recheado tipo morango	16,66	7,62	2,31	2,10	0,21	9,93
2002	Biscoito recheado tipo flocos	17,90	7,96	2,46	2,23	0,23	10,42
2002	Biscoito recheado sabor morango	16,56	4,70	4,11	3,13	0,98	8,81
2002	Biscoito recheado sabor chocolate	16,37	6,93	2,28	2,07	0,21	9,21
2001	Biscoito recheado sabor morango	22,72	5,51	3,62	2,87	0,75	9,13
2002	Biscoito recheado sabor chocolate	10,21	2,61	1,84	1,37	0,47	4,45
2002	Biscoito tipo Maria	12,15	2,23	1,76	1,15	0,61	3,99
2001	Biscoito sabor chocolate	17,04	4,37	4,35	4,04	0,31	8,72
2001	Biscoito amanteigado sabor banana e canela	18,89	4,48	5,23	4,87	0,36	9,71
2001	Biscoito amanteigado sabor leite	18,30	4,51	4,81	4,42	0,39	9,32
2002	Rosca de nata	21,38	9,76	3,65	3,10	0,55	13,41
<b>Média ± Desvio-Padrão</b>		<b>18 ±5</b>	<b>6 ±3</b>	<b>3 ±1</b>	<b>3 ±1</b>	<b>0,5 ±0,4</b>	<b>9 ±3</b>

polinsaturadas. No rodapé do quadro de informação nutricional deverão estar contidos os seguintes dizeres: “A ingestão de ácidos graxos *trans* deve ser a menor possível”<sup>20</sup>.

Avaliando os resultados obtidos no presente trabalho e as implicações à saúde pela ingestão dos ácidos graxos *trans*, deve-se considerar a reformulação da legislação brasileira em vigor. Deve-se exigir a declaração dos teores destes ácidos na rotulagem dos alimentos que apresentam em sua composição, gorduras hidrogenadas em quantidades elevadas. A atual legislação brasileira para gorduras modificadas não prevê limites para os teores de ácidos graxos *trans* em gorduras hidrogenadas<sup>14</sup>.

A implantação de processamentos tecnológicos adequados<sup>22,35</sup>, nas indústrias brasileiras, visando reduzir a formação dos ácidos graxos *trans*, será provavelmente uma consequência direta da exigência legal da limitação destes ácidos. O processo de interesterificação tem sido usado para aumentar o ponto de fusão das gorduras sem afetar o

grau de saturação ou causar isomerização em níveis significativos. Possíveis alternativas seriam a otimização dos parâmetros de hidrogenação ou a elaboração de misturas de gorduras sólidas e líquidas para atingir as características funcionais desejadas<sup>35</sup>.

Outra implicação, decorrente da exigência legal de limitação dos ácidos graxos *trans*, é a prevenção de doenças cardiovasculares e do desenvolvimento de obesidade em crianças e adolescentes brasileiros.

### CONCLUSÕES

Os teores de ácidos graxos saturados e *trans* isômeros de ácidos graxos foram similares na maioria das amostras de biscoitos analisadas, independentemente do fabricante, marca ou tipo.

Os ácidos graxos *trans* representaram uma porcentagem considerável do conteúdo total de lipídios dos biscoitos analisados.

Os resultados obtidos trazem subsídios para a reformulação da legislação em vigor, exigindo a declaração na rotulagem de biscoitos e outros produtos que contenham altos teores de ácidos graxos *trans* em sua formulação, face às implicações à saúde humana.

A limitação, através da legislação, dos teores de ácidos graxos *trans* em produtos elaborados com gorduras hidrogenadas incentivará a implantação de processamentos tecnológicos adequados nas indústrias brasileiras, visando reduzir a formação daqueles ácidos, e preservando a saúde do consumidor.

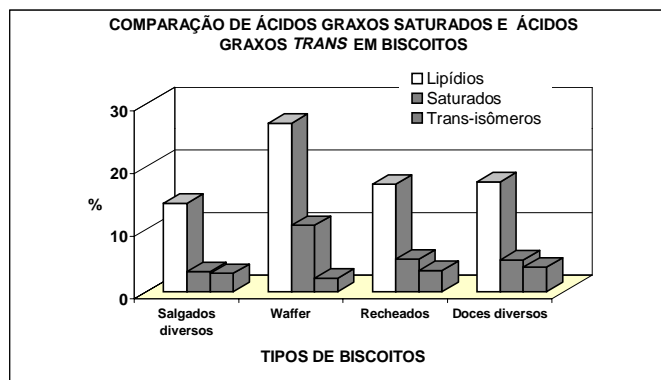


Figura 1. Comparação de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* em biscoitos

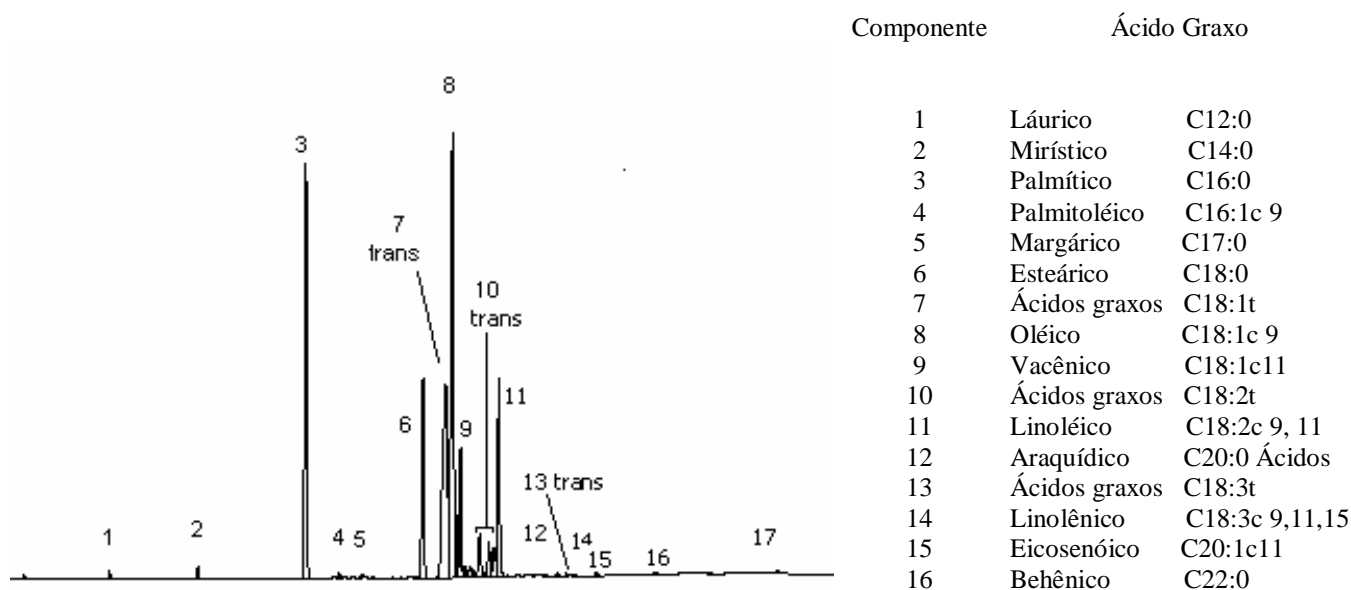


Figura 2. Cromatograma de ácidos graxos da gordura extraída de biscoitos.

Aued-Pimentel, S. et al. Saturated fatty acids versus *trans* fatty acids in cookies. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 131 - 137, 2003.

**ABSTRACT.** The ingestion of saturated fatty acids can eventually bring health risks. Scientific evidence shows that the intake of *trans* isomer fatty acids creates a similar effect as the intake of saturated fatty acids. Brazilian laws demand only to declare on the label the content of saturated fatty acids. Several products are made by using hydrogenated vegetable fat, which is rich in *trans* isomers fatty acids, for example cookies, which are generally eaten by children and adolescents. The objective of this work was to compare the contents of saturated fatty acids and *trans* isomer fatty acids in different cookie samples and supply Brazilian authorities with information to implement laws. Twenty six samples were analyzed in six different brands. The four types of cookies tested were: wafers, salty cookies, cream filled and several sweet ones. The composition of fatty acids from the fat extracted of the cookies (Soxhlet) was determined by gas chromatography. The contents of saturated and *trans* isomer fatty acids were similar in most samples, which showed a considerable percentage of the total lipids content. The results obtained will bring subsidies to reformulate the Brazilian laws, which will then demand that the content of *trans* isomer fatty acids, should be included on the labels of the cookie packets, and of other products with high content of *trans* isomer fatty acids, considering health implications.

**KEY WORDS.** fatty acids, *trans* isomer fatty acids, cookies, Brazilian legislation.

#### REFERÊNCIAS

1. Allison, D.B. et al. Estimated intakes of *trans* fatty and other fatty acids in the US population. **J Am Diet Assoc.**, 99: 166–74, 1999.
2. American Oil Chemists' Society. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 4<sup>th</sup> ed., Champaign, Il, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66: Preparation of methyl esters of long chain fatty acids).
3. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4<sup>th</sup> ed. Champaign, Il, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography).
4. American Oil Chemists' Society. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 4<sup>th</sup> ed., Champaign, Il, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1d-91 Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary GLC).
5. Aro, A. et al. Stearic acid, *trans* fatty acids, and dairy fat: Effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, 65: 1419–26, 1997.
6. Ascherio, A. et al. *Trans*-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. **Circulation**, 89:94–101, 1994.
7. Ascherio, A. et al. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, 340: 1994–98, 1999.
8. Badolato, E. S. G. **Aspectos analíticos da determinação de ácidos graxos *trans* em margarinas e gorduras vegetais hidrogenadas**. São Paulo, 2000 [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
9. Belitz, H.D. & Grosch, W. **Química de los alimentos: lípidios**. Cap. 3; 2<sup>nd</sup> ed., 175-269, 1992.
10. Bonanome, A., Grundy, S. M. Effect of dietary stearic acid on plasm cholesterol and lipoprotein levels. **N. Engl. J. Med.** 318: 1244-48, 1988.
11. Brasil, Leis, Decretos, etc. Lei n° 8.078, 11 de setembro de 1990. **Diário Oficial**, Brasília, 12 set, 1990. Seção I (supl.). p. 1-12. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências.
12. Brasil, Leis, Decretos, etc. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n° 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Informação Nutricional Complementar, 1998.
13. Brasil, Leis, Decretos, etc. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 40, de 21 de março de 2001. Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados, 2001.
14. Brasil, Leis, Decretos, etc. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n° 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais (Anexo 17), 1999.

15. Chen, Z.Y et al. *Trans* fatty acid isomers in Canadian human milk. **Lipids**, 30: 15, 1995.
16. Elias S.L, Innis, S.M. Bakery foods are the major dietary source of *trans*-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. **J. Am. Diet. Assoc.**, 102:46-51, 2002.
17. Emken, E.A. Nutrition and biochemistry of *trans* and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. **Ann. Rev. Nutr.**, 4:339-76, 1984
18. Emken, E.A. Physiochemical properties, intake, and metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, 62:659S-669S, 1995.
19. Fattah, A. G.; Fernandez, M. L.; Mc Namara; D. J. Regulation of guinea pig very low density lipoprotein secretion rates by dietary fat saturation. **J. Lip. Res. Jun.**, 36(6): 1188-98, 1995.
20. Federal Register, Washington, **Food and Drug Administration**, 15 nov. 2002, Food labeling: trans fatty acids in nutrition labeling nutrient content claims; and health claims; reopening of the comment period. [http://www.cfsan.fda.gov]
21. Garland, M. et al. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, 67:25-30, 1998
22. Gioelli, L. A. Modificação industrial de óleos e gorduras. In: **Curso de Pós-Graduação em tecnologia bioquímica-farmacêutica**, São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1997, p. 253. Apostila.
23. Gordura - Facilitando a produção. **Rev. Óleos & Grãos**, São Bernardo do Campo, 66: 12-14, 2002.
24. Holland, B. et al. In: **The composition of foods**. Mc Cance and Widdowson's, Cambridge, UK, 1994, p. 8-9.
25. Hui, Y.H. **Hydrogenation**. In: **HUI, Y.H.** Bailey's industrial oil and fat products. 15<sup>th</sup> ed., v.4, cap.4. p. 213-300, 1996.
26. Hulshof K. et al. Intake of fat and fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: the transfair study. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 53, 143-57, 1999.
27. IUPAC. **Standard methods for analysis of oils, fats and derivatives**. Blackwell Scientific Publications, 7<sup>th</sup> Edition (1987); IUPAC Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87.
28. Judd, J.T. et al. Dietary cis and trans monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. **Lipids**, 37(2): 123-31, feb 2002.
29. Kris-Etherton, P. M., YU, S. Individual fatty acids effect on plasma lipids and lipoproteins: human studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, 65(5):1628S-44S,
30. Larque, E.; Zamora, S.; Gil, A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. **Early Human Development**, 65: S31-S41, 2001.
31. Louheranta, A. M. et al. A high-*trans* fatty acid diet and insulin sensitivity in young healthy women. **Metabolism**, 48:870-75, 1999.
32. Mayes, P.A. Metabolism of unsaturated fatty acids & eicosanoids. In: Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W., eds. **Harper Biochemistry**. 24 ed. Stamford: Appleton & Lange, 1996, p.236-44.
33. Müller H, et al. Effect on plasma lipids and lipoproteins of replacing partially hydrogenated fish oil with vegetable fat in margarine. **Br. J. Nutr.**, 80:243-51, 1998.
34. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 3<sup>a</sup> ed., São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1985, v. 1.
35. Padovesi, R.; Mancini-Filho, J. Ácidos graxos trans. In: Curi, R.; Pompéia, C.; Miyasaka, C. K.; Procópio, J. **Entendendo as gorduras**. São Paulo: Manoli; 2002. cap. 36. p. 509-21.
36. Seppanen-Laakso, T. et al. Elaidic and *trans* vacenic acids in plasma phospholipids as indicator of dietary intake of 18:1 *trans* fatty acids. **J. Chromatogr. B**, 687:371-78, 1996.
37. Sugano, M.; Ikeda, I. Metabolic interactions between essential and *trans* fatty acids. **Curr. Opin. Lipidol.**, 7:38-42, 1996.
38. Wolff, LR.; Bayard, C.C. Improvement in the resolution of individual *trans* 18:1 isomers by capilar gas-liquid chromatography: use of a 100 m CP-Sil 88 column. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 72(10): 1197-201, 1995.

Recebido em 10/02/2003 ; Aprovado em 09/09/2003



## ***In vitro* vitotoxicity test as an alternative to *in vivo* Draize test for the evaluation of cosmetic**

---

Cruz, A. S. *In vitro* citotoxicity test as an alternative to *in vivo* Draize test for the evaluation of cosmetic - São Paulo – 2003. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]. Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

---

The procedures described by Draize are the basis of both ocular and cutaneous irritation tests and have been adopted internationally for *in vivo* evaluation of products and substances. However, they have been criticized for ethical reasons, due to their cruelty towards animals. Therefore, alternative methodologies are being studied to evaluate the toxicity of products, which have contact with human beings. Thus, a comparative study was performed between ocular, cutaneous and oral mucosa irritation tests using rabbits and *in vitro* tests through agar diffusion method and neutral red uptake method, both with the use of NCTC clone 929, FPC-IAL and SIRC cell lines. Lipsticks, makeup base, face powder, blushes, eye shadows, mascara, pencils and eyeliners, as well as liquid soap for children and adult use were evaluated. The *in vivo* tests and the cell lines used in the agar diffusion test were chosen according to the place where the products are used. Only the NCTC clone 929 lineage was used in the evaluation of all the samples. From the 204 analyzed samples, 141 were evaluated through the cutaneous irritation test and FPC-IAL lineage, 80 through the ocular irritation test and SIRC lineage, and 78 through the oral mucosa irritation test and FPC-IAL lineage. Only the samples of liquid soap were also evaluated through the neutral red uptake method with the three cells lines. The samples submitted to the *in vitro* evaluation were analyzed in different concentrations and the

observed parameter was cellular viability with the use of neutral red. The results obtained revealed that the agar diffusion test positive samples which presented up to degree 3 zone rate, that is cellular death halo varying from 0,5 to 1,0cm from the samples, according to USP 25, didn't provoke ocular, cutaneous or oral mucosa irritation. The samples which presented degree 4 zone also showed different degrees of ocular and cutaneous irritation, except to two units of liquid soap for children use which didn't present *in vivo* reactions, although citotoxicity up to 10% concentration. This method showed significant correlation with the ocular irritation test and also concerning the individual values of cornea and conjunctiva. As for the neutral red uptake test, it presented significant correlation in the ocular and cutaneous irritation test, what make it possible to infer that when the liquid soap samples present  $IC_{50}$  above 0,085% they won't cause ocular and cutaneous irritations in rabbits. No relation was observed between the origin of the cell lines and the target tissue used in the *in vivo* test, having all the cellular lines shown significant correlation with the NCTC clone 929 line. According to the data, the *in vitro* methods are more sensitive and the diffusion agar method, using the American Pharmacopeia graduation, can be adopted as a screening procedure in the evaluation of cosmetics. This is a result of its capacity of predicting irritation, what largely contributes for the reduction of animal using tests.

Available in the library of Conjunto das Químicas da USP  
and in the library of Instituto Adolfo Lutz  
e-mail: aurcruz@ial.sp.gov.br

## **Pesquisa de sítios de restrição enzimática em segmento da *ORF K1* do genoma de herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em isolados clínicos de São Paulo: relação com subtipos virais e implantação da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses) para determinar subtipos virais**

Moreira, A. A. - **Pesquisa de sítios de restrição enzimática em segmento da *ORF K1* do genoma de herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em isolados clínicos de São Paulo: relação com subtipos virais e implantação da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses) para determinar subtipos virais.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]. Orientador: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo.

A epidemia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) fez aumentar a incidência de sarcoma de Kaposi (SK) em todos os países e o SK passou a ser considerado doença definidora de AIDS. Desde a descoberta de seu agente etiológico, o herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de caracterizar subtipos virais presentes em todas as formas de SK: clássica, endêmica, iatrogênica e epidêmica. Os sistemas rotineiramente usados na subtipagem do HHV-8 têm usado o seqüenciamento de um gene que contém regiões hipervariáveis e que codifica uma glicoproteína de membrana viral (*ORF K1*). O presente trabalho apresenta um sistema de subtipagem alternativo que se baseia na presença de sítios de restrição enzimática em um pequeno segmento do gene *ORF K1*, região hipervariável 1 (VR1) e que permite discriminar subtipos virais. A análise de 68 seqüências; 50 que pertenciam a 36 pacientes com sarcoma de Kaposi infectados e não infectados pelo HIV-1 de São Paulo e 18 a protótipos dos subtipos A a E, mostraram mapas de restrição enzimática característicos dos principais subtipos virais descritos até o momento. Tomando como base apenas as enzimas disponíveis comercialmente, foram selecionadas cinco que se mostraram úteis para a subtipagem de HHV-8: *Taq I*, *Nsi I*, *Hinf*

*I*, *Hae III* e *Mse I*. Os resultados obtidos com a técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia de polimerase associada à análise do polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática) mostraram que de 48 espécimes brasileiros previamente classificados como sendo dos subtipos A, B e C por seqüenciamento gênico, todos foram corretamente subtipados pela técnica de PCR-RFLP. Três amostras (duas do subtipo A e uma do B) apresentaram mais um sítio de restrição enzimática além dos descritos como sendo os predominantes. Mais recentemente, outras 27 amostras de 18 casos de infecção por HHV-8 foram subtipadas pela PCR-RFLP. Houve detecção de oito isolados do subtipo A, sendo seis de variante predominante, um de variante minoritária conhecida e um de nova variante viral. Dois casos de infecção por HHV-8 do subtipo B e sete do subtipo C também foram identificados. Finalmente, um provável caso de infecção pelo subtipo E foi encontrado em paciente com SK-AIDS disseminado, resistente à quimioterapia. Na avaliação global, houve maior número de casos de infecção por HHV-8 dos subtipos A e C. Concluindo, devido à alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, rapidez e facilidade de execução, a técnica de PCR-RFLP pode ser usada em larga escala para estudos de epidemiologia molecular, principalmente em países em desenvolvimento.

Dissertação disponível na Biblioteca  
Digital de Teses e Dissertações da USP  
Site: [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)  
e-mail: [caterino@ial.sp.gov.br](mailto:caterino@ial.sp.gov.br)

## **Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo**

Carbone, P. H. L. - **Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo.** São Paulo, 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]. Orientador: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

O presente trabalho teve como objetivo otimizar ensaios sorológicos para serem utilizados na pesquisa de anticorpos dirigidos ao Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) e com eles explorar grupos de risco para adquirir, transmitir e desenvolver doença relacionada à esta infecção, como o sarcoma de Kaposi (SK). Tomando como base a literatura disponível, as condições do laboratório e a experiência profissional acumulada na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foram selecionados e utilizados os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) e Western blot (WB) para a pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos (Ag) de fase latente (LANA) e lítica da infecção por HHV-8. Para a padronização dos testes sorológicos foram utilizadas amostras de soro de 44 pacientes com SK e 21 controles sadios do Laboratório, e para o cálculo de prevalência de infecção HHV-8 em diferentes populações de São Paulo, soros de 3 grupos de indivíduos: • 477 pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK; • 683 pacientes institucionalizados com deficiência mental e/ou física; • 736 profissionais da área da saúde, sadios. Foram empregados na preparação das lâminas de IFI e nas tiras de WB respectivamente, as células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 ou estimuladas com forbol éster e o antígeno viral bruto obtido de sobrenadante de lisado das mesmas células. Os resultados obtidos na padronização da IFI-LANA mostraram baixa especificidade do ensaio devendo ser acompanhado pelo teste confirmatório de WB-LANA. Por outro lado, a IFI-Lítico se mostrou altamente sensível e específica, prescindindo do teste confirmatório de WB-Lítico. Este último, devido à complexidade de componentes antigênicos aliado aos diferentes perfis de reatividade de anticorpos encontrados em soros controle positivo e negativo, não se mostrou útil para ser empregado no presente trabalho.

Levando em consideração os resultados obtidos na IFI-LANA confirmados pelo WB-LANA e na IFI-Lítico, foi possível determinar a prevalência de infecção HHV-8 no grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK que foi de 19,3%, sendo detectados 4,8% de soros positivos para Ag LANA e 17% para Ag Lítico. Neste grupo de pacientes, houve associação estatisticamente significativa entre sorologia HHV-8 positiva, sexo masculino e prática homossexual. Baixas prevalências de anticorpos foram detectadas nos pacientes institucionalizados com deficiência mental e/ou física (1,6%) e nos profissionais da área da saúde (1,1%). Anticorpos dirigidos a Ag LANA foram encontrados em 0,6% e 0,95% dos casos, e para Ag Líticos em 1,0% e 0,3% dos casos, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que São Paulo não é região endêmica desta infecção viral e que pacientes institucionalizados e profissionais da área da saúde não são grupos de alto risco para adquirir e transmitir o HHV-8; nenhum caso de SK foi relatado neste grupo de indivíduos na ocasião da coleta das amostras de soro. Quanto ao grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK, embora 19,3% deles tenham resultado sorologia HHV-8 positiva sendo a maioria para Ag de fase lítica de replicação viral, apenas 2% desenvolveram SK em estudo longitudinal de 5 anos. A explicação encontrada para o baixo número de casos de SK nesta população de indivíduos foi a introdução em 1994, de terapia anti-retroviral em São Paulo, que mudou o curso da infecção HIV e das doenças à ela associadas. Enfim, foi possível implantar ensaios sorológicos de pesquisa de anticorpos específicos, que juntos, apresentam alta sensibilidade e especificidade e que podem ser empregados em levantamentos epidemiológicos e no diagnóstico de infecção HHV-8.

Dissertação disponível na Biblioteca  
Digital de Teses e Dissertações da USP  
Site: [www.theses.usp.br](http://www.theses.usp.br)  
e-mail: [caterino@ial.sp.gov.br](mailto:caterino@ial.sp.gov.br)



## Evaluation of culture media in the primary isolation and presumptive identification of yeasts from different biological samples

---

Silva, J. O. **Evaluation of culture media in the primary isolation and presumptive identification of yeasts from different biological samples** . Jaboticabal; 2001. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Área de Concentração em Microbiologia]

---

In view of the increase in yeast infections, especially polymicrobial ones, differential culture media have acquired increasing importance. The study evaluated the Sabouraud chloramphenicol, Biggy agar, Pagano Levin agar and CHROMagar Candida media in terms of inhibition, isolation, quantification and morphological characteristics of the yeasts colonies; it also compared the classical identification with the API20C AUX system and it observed of yeast microbiota in the different biological samples. To this end, we used 223 biological samples, including feces, and vaginal, oral and anal mucosae contents from 86 patients presenting or not symptoms. Sabouraud chloramphenicol agar was the least effective in the bacterial inhibition and favored a greater development of the

filamentous fungi. The four media did not differ significantly in the numbers of yeasts. Eighteen species belonging to the genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* and *Hansenula* were detected. The API20C AUX system correctly identified 92% of the species, although with the need for additional tests in 16% of cases. CHROMagar Candida e Biggy agar were complementary in the isolation of the different species and favored a greater recovery of polymicrobial cultures. Pagano Levin agar isolated the smallest variety of species. CHROMagar Candida enabled the presumptive identification of *C. albicans*, predominant species in the different samples. The results suggest that more than one culture medium should be used for in adequate first isolation.

Available in library of Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias de Jaboticabal – UNESP  
and in the library of Instituto Adolfo Lutz.  
**e-mail:** jaquelineos@ig.com.br

## Comparative study of urinary cytology in urine and bladder washing samples, and between simple smear, membrane filter and cytocentrifugation techniques

Sakai, Y. I. **Comparative study of urinary cytology in urine and bladder washing samples, and between simple smear, membrane filter and cytocentrifugation techniques.** São Paulo; 2002.[ Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo].

To verify if there is any influence on bladder transitional cell carcinoma detection when biologic specimens are obtained, directly, from urine samples or bladder washing, with variable volumes and analyzed by three different procedures. Prospectively, ninety eight patients with transitional cell carcinoma of bladder were evaluated for urinary cytology. Urine and bladder washing specimens were divided in 10 ml and 100 ml samples and they were processed to obtain slides to be studied by cytocentrifuge, membrane filter (Millipore) and simple smear techniques. They were submitted to modified Papanicolaou staining and classified as positive, suspicious and negative. The surgical specimens were processed by standard histological techniques, and the tumors graded according to the Ash system. Data were analyzed using Q Cochran's test and McNemar test, considering type one error of  $< 5\%$ . Urine samples obtained from patients with grades I, II, III and IV tumors were classified cytologically as positive, respectively, in 25%, 79,9%, 95% and 85,4% by membrane filter, in 29,2%, 73,5%, 81,8% and 68,3% by cytocentrifuge of 10 ml, in 18%, 68,2%, 79,7% and 75,6% by simple smear of 10 ml, in 44,4%, 84,6%, 88,8% and 75,6% by cytocentrifuge of 100 ml and in 32%, 75,1%, 85,5% and 78% by simple smear of 100 ml. Bladder

washing samples obtained from patients with grade I, II and III tumors were classified cytologically as positive, respectively, in 94,7%, 96,8% and 100% by membrane filter, in 93,6%, 94,3% and 97,6% by cytocentrifuge of 10 ml, in 65,2%, 85,5% and 97,6% by simple smear of 10 ml, in 95,7%, 96,4% and 100% by cytocentrifuge of 100 ml and in 83,1%, 87% and 100% by simple smear of 100 ml.

Comparative samples of urine and bladder washing. The mean positivity in the urine were 37,6%, 82,4% and 88,4%, and in the bladder washing were 94,3%, 96,4% and 99,2%, in tumors grade I, II and III, respectively. The oncotic cytology on bladder washing samples was superior to urine samples cytology, and also cytocentrifuge or membrane filter over simple smear technique in bladder washing or urine samples of grade I or II tumors. The increase of urine or bladder washing samples volume, improved the positivity of cytology by simple smear technique for grade I or II tumors, or by cytocentrifugation technique for grade I tumor. In Grade III or IV tumors, the technique, the type or the volume of samples do not change results, except for simple smear of 10 ml of urine that was worse. Among all the techniques, samples or volume, the best results were obtained with cytocentrifuge of 100 ml and the worst was of simple smear of 10 ml.

Available in the library of Instituto Adolfo Lutz  
e-mail: yursakai@ial.sp.gov.br  
itoyuri99@hotmail.com

## Avaliação de uma unidade produtora de alface (*Lactuca sativa*) minimamente processada visando a implementação do sistema APPCC

Cruz, A. G. da - Avaliação de uma unidade produtora de alface (*Lactuca sativa*) minimamente processada visando a implementação do sistema APPCC. Rio de Janeiro, 2002 [Dissertação de mestrado- Instituto de Química – UFRJ]. Orientadores: Maria Cristina Antun Maia e Sérgio Agostinho Cenci.

O consumo de vegetais minimamente processados vem sofrendo aumento significativo por parte da população brasileira devido a tendência crescente de consumir alimentos industrializados com o atributo de produtos frescos. Entretanto, a ausência de uma etapa de efetiva de morte microbiana no processo faz aumentar a preocupação com relação a segurança microbiológica desses produtos. Com o objetivo de verificar a viabilidade da implementação do sistema APPCC em uma linha de produção de alface minimamente processado, uma unidade produtora de pequeno porte no Estado de São Paulo foi avaliada, através de *check-lists*, com relação aos Programas Pré-requisitos de Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Padrão de Higienização Operacional (PPHO). Análises Microbiológicas de bactérias mesófilas (alface e ambiente), psicrófilas, *Pseudomonas sp*, *Salmonella sp* e Bolores e Leveduras(alface), Coliformes totais (alface, água de irrigação, água de processamento, equipamentos/utensílios), *Escherichia coli* (alface, água de irrigação e processamento, manipuladores) e *Staphylococcus aureus* (manipuladores) foram executada e Análises Físicas (temperaturas dos tanques de lavagem e sanitização, câmaras de armazenamento da matéria-prima e produto final) visando identificar fontes de contaminação e crescimento microbiano longo da produção agrícola e da linha de processamento. Controle e registros ineficazes de pesticidas e metais pesados na água de irrigação; monitorização inadequada do processo de compostagem; ausência de procedimentos documentados de higienização de equipamentos/utensílios utilizados no cultivo, colheita e transporte; inexistência de instalações sanitárias adequadas; inexistência de programas de treinamento em higiene para o pessoal envolvido na colheita e ausência de um profissional capacitado para gerenciar a aplicação de agrotóxicos e pesticidas foram as principais não-conformidades detectadas na auditoria de BPA. Lay-out do processo inadequado expresso pela inexistência da separação entre a área de recepção da matéria-prima das demais áreas; pisos dotados de superfície não-sanitária; falhas no revestimento e pintura das paredes e tetos; ausência de *chiller* para resfriamento da água de processo; presença de funcionários

utilizando adornos na linha de processamento; matéria-prima e produto final expostos por demasiado período fora da refrigeração; caixas plásticas de armazenamento do produto final e da matéria-prima fora dos *pallets*; ausência de monitoramento da temperatura, concentração e tempo de contato do sanificante durante o processamento; tempo de centrifugação do produto não-padronizado; inexistência de programas de controle de pragas e de procedimentos operacionais e instruções claras padronizando cada atividade do processo, assim como panilhas de controle associados, normalmente escritos em um manual de BPF foram as principais não-conformidades detectadas Ausência de PPHOs foram visualizadas tanto para BPA e BPF. A etapa de sanitização propiciou a redução de um ciclo logarítmico para *Pseudomonas sp* e psicotróficos ( $10^6$ - $10^5$  UFC/g), redução do número mais provável de coliformes totais (de 26 para 18 NMP/g), mostrando-se entretanto ineficaz para os mesófilos que permaneceram com  $10^6$  UFC/g ao longo da linha de processamento. Observou-se aumento de um ciclo logarítmico ( $10^3$  para  $10^4$ UFC/g) para bolores e leveduras e para Coliformes fecais com aumento de 11 para 15 NMP/g entre as etapas de sanitização e produto final. *Escherichia coli* foi encontrada no produto final. Não foi detectada *Salmonella sp* em nenhuma das fases do processo. A água de irrigação e de processamento apresentaram resultados  $<2 - >16$  NMP/ml para coliformes totais e fecais e ausência de *E. coli*. Os equipamentos/ utensílios apresentaram 240- 2400 NMP/cm<sup>2</sup> para coliformes totais e 7 para coliformes fecais. *S.aureus* mostrou-se ausente e *E. coli*. foi encontrada em dois manipuladores da seção de empacotamento do produto final. Bolores e leveduras e mesófilos foram detectados no ambiente de processamento em faixa de 28-168 UFC e 43-274 UFC/15 minutos, respectivamente. Temperaturas de 4,2 e 4,8°C foram registrados para as câmaras de armazenagem de matéria-prima e produto final, respectivamente e de 19,5°C para os tanques de lavagem e sanitização. Os resultados mostram que a unidade produtora não possui as condições necessárias para a implementação do sistema APPCC, sendo necessários aprimoramentos nos Programas Pré-Requisitos de BPA, BPF e PPHO.

Tese disponível na biblioteca do Instituto de Química da UFRJ  
e-mail: food@globo.com

## Antigenic expression of LPS from brazilian meningococcal strains, production of monoclonal antibodies as subsidy to epidemiological studies

---

Belo, E. F. T - **Antigenic expression of LPS from brazilian meningococcal strains, production of monoclonal antibodies as subsidy to epidemiological studies.** São Paulo; 2002. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP ] Área de Análises Clínicas. Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari.

---

The profile of antigen expression among meningococci is important for epidemiology surveillance and vaccine development. To this end two new mouse monoclonal antibodies (MAbs) have been produced against *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharide (LPS). The MAbs were reactive against outer membrane antigens and present bactericidal activity. They were tested against different meningococcal strains 118 strains of serogroup A, 66 strains of serogroup C (1972 to 1974) and 293 strains of serogroup B (1992) meningococci by Dot-ELISA. Our results demonstrated that the expression of LPS (immunotypes) in the *N meningitidis* Brazilian strains studied is heterogeneous. The prototypes and subtypes of B:4:P1.15, B:4:P1.9, B:4:P1.7, B:4:P1.14,

B:4:P1.16, B:4:NT and B:NT:NT were detected in *N.meningitidis* B serogroups. The strains C:2a:P1.2 and A:4,21:P1.9 were dominant in the C and A serogroups respectively. FACS analysis showed that the MAbs immunotypes recognized LPS immunotypes on the surface of *N.meningitidis*. The immunotype L<sub>379</sub> was strongly expressed in 90% of *N.meningitidis* B compared with 67% in serogroup C and 18% in serogroup A, whereas L<sub>1</sub> and L<sub>8</sub> were weakly to moderately expressed by 7% and 15% in serogroup B and 3% serogroup A and was not expressed in serogroup C. The importance of establishment a broad set of immunotypes antigens characteristics of the prevalent strain during one epidemic is important for vaccine preparation.

Apoio Financeiro: FAPESP Available in the library of  
Conjunto das Químicas da USP  
e-mail: egaspari@ial.sp.gov.br

## Study of systemic immune response in mouse after inoculation by different immunization routes with *Escherichia coli* O86:H34 strain alive or formalin-killed.

Oliveira, A. P. da S. - **Study of systemic immune response in mouse after inoculation by different immunization routes with *Escherichia coli* O86:H34 strain alive or formalin-killed.** São Paulo; 2001.[ Dissertação de mestrado -Faculdade de Ciências Farmacêuticas - U.S.P]. Área de Análises Clínicas. Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari.

Enteropathogenic *Escherichia coli* is one of the major etiologic agents that causes infectious diarrhea both in infants and in adults individuals . EPEC infections are prevalent in countries in development, mainly in low social-economic populations, as those found in Brazil. The immune response to this infection is still insufficiently known . The use of new technologies in the development of vaccines has been reinforced the importance of taking in account the natural route of infection of pathogens and use of it in investigation on immune response to be elicited against a certain infectious agent. The aim of the present investigation was to study the immune response in mice inoculated with dead or alive bacteria, by means of diverse immunization routes, using the *E. coli* O86:H34 strain and the *E. coli* O127:H6 prototype were employed for immunization . *E. coli* strain belonging to O86:H34 serotype, was isolated from faeces from infants with diarrhoea. The strains: E2348/69, E2348/69 flic-, E2348/69  $\Delta$ tir, E2348/69 EscN-, CVD 206  $\Delta$ eaA, UMD 872  $\Delta$ EspA, UMD 874  $\Delta$ EspB, UMD 870  $\Delta$ EspD. were employed . BALB/c mice were inoculated by intragastric route with alive

*E. coli* O86:H34 strain or formalin-killed O86:H34 and O127:H6 strain intragastric and intramuscular immunizations routes .

The specific antibodies of isotypes IgA, IgG and IgM were determined by means of ELISA and the course of the immune response for important antigens that participate in the pathogenicity mechanism of bacteria could be analysed . By means of reactivity profile on immunoblotting, the specificity of the antibodies present in obtained sera against whole cells or the outer membrane complex of the bacteria were analysed . Immune response to proteins, like EspA, EspB, Tir, intimin, flagelin e BFP in immunized mice , may have an important meaning in the elucidation of infection in this pathogen. At the first time a research using different routes of immunization with EPEC strains in mice has been conducted . This study allow to compare antigens from *E. coli* recognized in natural or experimental human infection and consequently these data may help in the elucidation of this complex mechanism of pathogenicity, and also to orientate the selection of peptides to be used in preparation of specific vaccines.

Apoio Financeiro: FAPESP Available in the library of  
Conjunto das Químicas da USP  
e-mail: egaspari@ial.sp.gov.br

## Use of monoclonal antibodies in the selection of LPS from the epidemic strain B:4:P1.15 of *Neisseria meningitidis* B: nasal immunization

Coutinho, L. M. C. C.- Use of monoclonal antibodies in the selection of LPS from the epidemic strain B:4:P1.15 of *Neisseria meningitidis* B: nasal immunization . São Paulo; 2002. [Dissertação de mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas - U.S.P]. Área de Análises Clínicas. Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari.

Meningococcal disease poses a serious public health problem, due to their characteristics of being highly epidemic, with a high mortality rate. This fact led many research centers to turn their efforts to the development of a vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B. The vaccines available at the present time are directed to serogroups A, C, Y and W135. In order to obtain a safe vaccine, many of the antigens of the outer membrane of the bacteria are being studied. Among the components being studied for eventual use in a vaccine against *N. meningitidis* B are the lipopolysaccharides (LPS). Lipopolysaccharides are complex macromolecules lipoprotein which integrate the outer membrane of gram-negative bacteria. It is interesting that many of the studies involving these molecules have shown adjuvant characteristics in the immune response against *N. meningitidis* B. However, there is a problem with these molecules, due to the toxic effects of the lipid A present in their structure. The present study had the aim of evaluating the specificity and protective activity of the antibodies induced in an animal model by the outer membrane complex (OMC) obtained from strains of *N. meningitidis* B:4:P1.15. The strains used for immunization of mice were selected through colony-blot, using anti L3,7,9 and L8 monoclonal antibodies, for the highest and the lowest expression of the LPS of immunotypes L3,7,9 and L8. First we selected the strains using colony blots, then we performed the extraction of the OMC of the bacteria belonging to the selected strains (B:4:P1:15 L3, 7, 9 $\uparrow$ , B:4:P1.15 L3, 7, 9 $\downarrow$ , B:4:P1:15 L8 $\uparrow$  and B:4:P1:15 L8 $\downarrow$ ) followed by, the intranasal (IN) and intramuscular (IM) immunization of the BALB/c mice with the purified OMC. The present study analyzed the reactivity of the antibodies (IgM, IgG and IgA) found in the serum and in the saliva of mice who were immunized IN or IM, as well as the presence in the serum of antibodies with bactericidal activity. In the serum of the IN immunized mice, antibodies found four months and one year after immunization and with cross-reactivity against a whole-cell suspension of heterologous strains of *N. meningitidis* bacteria (B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT and C:2a:P1.2) were also tested. The analysis of the presence of antibodies in the serum (obtained 30 after immunization) and in the saliva showed

reactivity against both the whole-cell bacteria and the OMC of the strains selected. In study of antibodies found four months and one year after the immunization against the strains B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT and C2a:P1.2 only the reactivity against the whole-cell suspension of the bacteria were analyzed. The results of the ELISA test shows that IM immunized mice produced higher levels of antibodies of the IgG isotype and the IN immunized ones produced higher levels of antibodies of the IgG and IgA isotypes, specific against whole-cells of homologous and heterologous strains of *N. meningitidis*. The analysis of specificity through the Immunoblotting of the antibodies found in the serum of the IM and IN immunized mice revealed that the response was directed mainly against the proteins of classes 1, 2 and 5, and also against proteins 50, 65 and 70 kDa of the whole-cell suspension bacteria and the OMC of strains B:4:P1:15 L3, 7, 9 $\uparrow$ , B:4:P1:15 L3, 7, 9 $\downarrow$ , B:4:P1.15 L8 $\uparrow$  and B:4:P1:15 L8 $\downarrow$ . The specificity of antibodies of isotypes IgG and IgA (obtained from the serum of intranasally immunized mice) against strains B:4:P1.9, B:14NT, B:4:NT and C.2a.P1.2 revealed that the response was directed mainly against proteins of molecular weight higher than 50 kDa. In the saliva of IN immunized mice the reaction of antibodies of the IgA isotype was also observed by ELISA and Immunoblotting. The response was directed against proteins of 28 kDa, 33 kDa and higher than 50 kDa. When the antigen preparations obtained from the strains with the highest and lowest expressions of immunotypes L3,7,9 and L8 were compared, no significant differences were found by ELISA. Immunoblotting analysis, however, showed differences in the specificity of the response, particularly for peptides of high molecular mass. The titers obtained by the assay of bactericidal assay were higher for the mice IN immunized with strains selected for LPS L3, 7, 9 and L8. The results of antibodies' specificity indicate that the selection of LPS may be important to elicit systemic as well as local mucosal effective immune response, when used in an intranasal vaccine preparation. This work indicates the importance of selecting LPS immunotypes in order to obtain a meningococcal vaccine capable of inducing a lasting immunity in people of all ages, in both the mucosal and the systemic modes of admission.

Apoio Financeiro: FAPESP Available in the library  
of Conjunto das Químicas da USP  
e-mail: [egaspari@ial.sp.gov.br](mailto:egaspari@ial.sp.gov.br)

## Trichothecenes in corn: optimization and evaluation of gas chromatography associated to mass spectrometry method and survey in corn and corn-based products in São Paulo state

Milanez, T.V. **Trichothecenes in corn: optimization and evaluation of gas chromatography associated to mass spectrometry method and survey in corn and corn-based products in São Paulo state.** Campinas, 2003. [Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP]

A great number of the fungal species, under specific conditions, can produce toxic secondary metabolites known as mycotoxins. About 20 groups of such toxins are known today but some have received special attention due to their toxicity and widespread natural occurrence: aflatoxins, zearalenone, ochratoxin A, fumonisins and trichothecenes. The trichothecenes constitute a group of more than a hundred compounds characterized by the presence of the system 12,13-epoxy-trichotec-9-en in their structures. However, most of the known trichothecenes have been isolated only in laboratory conditions. Just a few have been isolated and characterized as natural contaminants. Among them, deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxin T-2 (T2), diacetoxyscirpenol (DAS) and less frequently the derivatives 3-acetyl-deoxynivalenol (3-Ac-DON), 15-acetyl-deoxynivalenol (15-Ac-DON), fusarenone X (FX) and the toxin HT-2 (HT2). DON is the trichothecene most frequently found in foods and feeds and it's also the less toxic of this family. Despite the fact that corn is one of the substrates more susceptible to this type of contamination, there is little information on the occurrence of trichothecenes in Brazilian corn. Brazil ranks third in world production of corn, harvesting about 30 million tons annually, and corn is a grain with great impact in Brazilian economy. These facts point to the need to evaluate the extension and the type of trichothecene contamination in national corn. On the other hand, the similarity of the trichothecene chemical structures requires the use of a high resolution gas chromatographic method for their separation. The differing toxicities for the members of this group of toxins requires, by their turn, that the identity of each toxin be confirmed by a system capable of great degree of reliability such as mass spectrometry. The present work aimed at evaluating the occurrence of trichothecenes in corn planted in the state of São Paulo and in corn products commercialized in the city of São Paulo. DON and NIV were chosen for this

investigation due to their worldwide occurrence. DAS, HT2 and T2 were included due to their high toxicity and their natural occurrence in foods and feeds. In order to reach the objectives of the present work, a gas chromatography/ mass spectrometry method for simultaneous determination of these five trichothecenes was optimized and evaluated. After optimization the method presented detection limits ranging from 20 to 60 ng/g for DON, from 10 to 40 ng/g for NIV, 20 to 120 ng/g for DAS, 20 to 50 for HT2 and from 20 to 100 ng/g for T2, varying according to the tested matrices (dried corn, canned sweet corn, corn grits, corn flour, hominy sweet meal, corn meal and corn flakes). Similarly, the recoveries ranged from 83,0 to 113,0% for DON, 84,6 to 114,5% for NIV, 52,1 to 122,7% for DAS, 81,8 to 155,4% for HT2 and 71,1 to 95,9% for T2. A survey was conducted in samples of corn grown in São Paulo state and also in corn-based products commercialized in the city of São Paulo. Eighty samples of corn from two cooperatives located in the state of São Paulo were analysed. Eleven samples presented traces of NIV and another sample had traces of DON. Besides that, five samples showed levels of NIV ranging from 51 to 106 ng/g and one of them was co-contaminated with 71 ng/g of DON. Seventy-eight samples of corn-based products commercialized in São Paulo city were analyzed. Among these samples, only one sample of corn flour, presented DON and NIV. Another sample of corn grits, had the toxins T2 and HT2 at the levels of 555ng/g and 767 ng/g, respectively. The results of the two surveys during the years 2000 to 2002, indicated a low occurrence of trichothecenes, and as a consequence a low risk for the consumers. Due to the well known variability in mycotoxins contamination of foods from year to year, only after several years of surveying corn planted in the state of São Paulo and corn products commercialized in the city of São Paulo, it will be possible to have a complete picture of the contamination of trichothecenes in corn and corn products.

Financial Support: FAPESP  
Available in the library of Faculdade de Engenharia de  
Alimentos – UNICAMP  
and in the library of Instituto Adolfo Lutz.  
e-mail: thaismil@ial.sp.gov.br

---

## ERRATA VOLUME ANTERIOR

**Rev. Instituto Adolfo Lutz, 62(1), 2003 – Artigo RIALA6/939**

Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência

The determination of cholesterol in eggs: a comparison of an enzymatic method with that of high performance liquid chromatography

Pag. 49 a 54: onde se lê Correia, M. e Roncada, M. J.: Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. II. Geléias de frutas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 49-54,2003 **LEIA-SE** Mazalli, M. R.; Saldanha, T. e Bragagnolo, N. - Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 49-54,2003.



ISSN 0073-9855



9 770073 985009