

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 62 número 1, 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 (1)

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 ( nºs 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

- 930 **Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais.**  
Microbiological Evaluation of Soft Drink Samples Marketed in the State of Minas Gerais.  
Vanessa A. D. MORAIS, Jovita E. G. C. MADEIRA, Edilânia C. DIAS, Ana Carla BONCOMPAGNI, Rúbia C. P. GONÇALVES e Eunice de CARVALHO ..... 1 - 4
- 931 **Perfil bacteriológico da tuberculose pulmonar na região de Campinas e das Dirs XII, XV e XX - 1999/2000.**  
Bacteriologic profile of lung tuberculosis in the Campinas Region and XII, XV and XX Dirs, 1999/2000  
Dalva C. G. AILY, Maria de Lourdes M. SHIKAMA, Maria Lúcia F. OLIVEIRA e Rosangela M. SILVA ..... 5 - 10
- 932 **Avaliação de metodologia para a detecção de resíduos de terra diatomácea em grãos de trigo e farinha**  
**Evaluation of the methodology for detection of diatomaceous earth residue (de) in wheat grain and flour**  
Márcia B. ATUI, Flávio A. LAZZARI e Sonia M. N. LAZZARI ..... 11 - 16
- 933 **A dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> pode ser feita a partir de amostra de hemolisado com saponina ?**  
Could the saponin hemolysate be used for the hemoglobin A<sub>2</sub> dosage ?  
Raimundo A. G. OLIVEIRA, Fabiano P. FALCÃO, Maria do Socorro G. OLIVEIRA, Marilena OSHIRO e Orlando C. de O. BARRETTO ..... 17 - 20
- 934 **Carotenoids of tomato and tomato paste: verification of the occurrence of g-carotene**  
Carotenóides de tomate e extrato de tomate: verificação da ocorrência de g-caroteno  
Mieko KIMURA e Delia RODRIGUEZ-AMAYA ..... 21 - 26
- 935 **Contaminantes microbiológicos em detergentes e seus congêneres**  
Microbiological contaminants in detergents and similars  
Adriana BUGNO, Adriana A. BUZZO, Tatiana C. PEREIRA e Maria Cristina SANTA BÁRBARA ..... 27 - 30
- 936 **Frequência de esfregaços cérvico-vaginais anormais em adolescentes e adultas: revisão de 308.630 casos**  
Frequency of abnormal uterine cervix smears from adolescents and adult women: review of 308,630 cases.  
Adhemar LONGATTO FILHO, Daniela ETLINGER, Natália S. GOMES, Sheila V. da CRUZ e Maria José CAVALIERI ..... 31 - 34
- 937 **Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida**  
Cellularity evaluation in liquid-based cytology preparations  
Sonia M. M. PEREIRA, Maria Lúcia UTAGAWA, Janaína E. PITTOLI, Luciana S. AGUIAR, Marina Y. S. MAEDA, Adhemar LONGATTO FILHO, Celso di LORETO, Cecília ROTELI- MARTINS, Janice O. GALVANE, Cláudia Maria WOLF, Sonia F. FIGUEIREDO e Kari SYRJANEN ..... 35 - 39

938	<b>Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e fungos filamentosos. II. Geléias de frutas</b> Standardization of method and quantification of extraneous materials and mycelial of molds. II. Fruit jams. Marlene CORREIA e Maria José RONCADA .....	41 - 48
939	<b>Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência</b> The determination of cholesterol in eggs: a comparison of an enzymatic method with that of high performance liquid chromatography. Mônica R. MAZALLI, Tatiana SALDANHA e Neura BRAGAGNOLO .....	49 - 54
Artigo de Revisão/ Review Article		
940	<b>Folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas</b> <i>Eugenia uniflora</i> L. “brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties Mariangela T. AURICCHIO e Elfried. M. BACCHI .....	55 - 61

#### RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

<b>Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by pollen and physical – chemical analysis.</b> Cano, C.B .....	63
<b>Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by Thermoanalysis</b> Felsner, M.L .....	64
<b>Food microscopy of processed fruit products, marketed in the supermarkets of São Paulo, SP</b> Correia, M .....	65
<b>Pharmacognostic Characterization of <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg Myrtaceae</b> Markman, B. E. O .....	66

## Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais.

### Microbiological evaluation of soft drink samples marketed in the state of Minas Gerais

Vanessa A. D. MORAIS<sup>1\*</sup>  
Jovita E. G. C. MADEIRA<sup>1</sup>  
Edilânia C. DIAS<sup>2</sup>  
Ana Carla BONCOMPAGNI<sup>2</sup>  
Rúbia C. P. GONÇALVES<sup>2</sup>  
Eunice de CARVALHO<sup>3</sup>

RIALA6/930

Morais, V. A. D. et al. - Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 1 - 4 ,2003

**RESUMO.** Com o objetivo de avaliar as condições higiênicas dos refrigerantes, foram analisadas 100 amostras de diferentes marcas, nos sabores de cola, guaraná e frutas. As amostras, em embalagens Pet 2 litros, foram coletadas aleatoriamente no período de março a novembro de 2000, em estabelecimentos comerciais, pela Vigilância Sanitária do Estado (VISA/MG). Foram utilizadas duas metodologias distintas para enumeração de fungos viáveis em bebidas e Número Mais Provável para bactérias do grupo Coliforme (APHA, 1992). A primeira técnica utilizada para enumeração de fungos foi a do espalhamento em superfície, em placas contendo o meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), e a segunda, a técnica de membrana filtrante, empregando dois meios: M-Green Yeast and Mold e o meio DRBC. 13% das amostras foram condenadas como produtos em condições higiênicas insatisfatórias por apresentarem contagens de bolores e leveduras superiores à 20UFC/mL (Portaria 451/97 do MS/SVS – item XII, inciso a). Destas, 46,2% apresentaram leveduras, 30,8% leveduras e fungos filamentosos, e 23% fungos filamentosos. Não foram detectadas bactérias do grupo coliforme (ausência em 50 mL da amostra). Das amostras condenadas, 92,3% eram provenientes de indústrias classificadas como ruins ou precárias de acordo com suas instalações.

**PALAVRAS-CHAVE.** Refrigerantes; bolores; leveduras e coliformes

<sup>1</sup>Fundação Ezequiel Dias – Núcleo de Micologia e Micotoxinas – IOM

<sup>2</sup>Bolsista do CNPq – Núcleo de Micologia e Micotoxinas - IOM

<sup>3</sup>Fundação Ezequiel Dias Laboratório de Microbiologia – IOM

\*Endereço para correspondência: Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP: 36510-010 – Tel 0 XX (31) 33719462. Fax 0 XX (31) 33719553 - e-mail: vam@funed.mg.gov.br

**APOIO FINANCEIRO:** Ministerio da Saúde/ANVISA.



## INTRODUÇÃO

Refrigerantes são bebidas não alcoólicas, consumidas mundialmente por milhões de pessoas, produzidas com água, açúcar, suco natural ou extrato vegetal, corante, acidulante, antioxidante, aromatizante, conservador e gás carbônico.

Considerados alimentos de alta atividade de água ( $a_w > 0,90$ ) e alta acidez ( $\text{pH} < 3,7$ ) os refrigerantes são passíveis de contaminação por bolores (fungos filamentosos), leveduras (fungos unicelulares)<sup>8</sup> e coliformes<sup>7</sup>.

Os fungos constituem um grande e diversificado grupo de microrganismos composto por milhares de espécies que podem ser detectadas no solo, ar, água e alimentos. Eles são organismos eucariotas, aclorofilados, heterotróficos, com reprodução sexuada e assexuada, capazes de utilizar uma grande variedade de substratos como fontes de carbono, nitrogênio e energia<sup>13</sup>.

A enumeração de fungos viáveis, em bebidas, usualmente é feita pela técnica de espalhamento em superfície<sup>6</sup>. No caso de água potável, bebidas e similares recomenda-se também a técnica de membrana filtrante<sup>6</sup>.

O grupo dos coliformes totais inclui cerca de 20 espécies e é constituído por bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás<sup>7</sup>.

A enumeração de coliformes totais viáveis em bebidas usualmente é feita pela técnica de Número Mais Provável (NMP)<sup>7</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença dos fungos e coliformes totais em amostras de refrigerantes de diferentes marcas e sabores, envasadas em embalagens flexíveis (Pet/2litros) e comercializadas no Estado de Minas Gerais. Os padrões microbiológicos foram verificados segundo a Portaria 451/97 do MS/SVS - item XII inciso a<sup>1</sup>. Esta Portaria estabelecia os limites de 20 unidades formadoras de colônias (UFC) de bolores e leveduras por mL da amostra e ausência de coliformes totais em 50mL da amostra. Entretanto, a partir de 2 de janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária adotou a Resolução nº12<sup>2</sup> que aboliu a contagem de bolores e leveduras das análises deste alimento, deixando o controle higiênico a cargo das indústrias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostragem

As 100 amostras de refrigerantes foram coletadas aleatoriamente, em estabelecimentos comerciais do interior e da capital do Estado de Minas Gerais/Brasil, pela Vigilância Sanitária (VISA/MG), no período de março a novembro de 2000. Destas, 46% possuíam sabor de frutas (abacate, abacaxi, framboesa, laranja, limão, maçã, mexerica, morango, tangerina

e uva), 43% de guaraná e 11% de cola. As análises foram efetuadas em três repetições.

As indústrias produtoras de refrigerantes foram classificadas, como: A= boa, B= regular, C= ruim, D= precária. Esta classificação foi feita de acordo com os aspectos gerais de suas instalações, qualidade da água e da matéria prima, área de manipulação, equipamentos e utensílios. As visitas às indústrias foram realizadas no decorrer do estudo.

## 2. Metodologia

### 2.1 Contagem de bolores e leveduras após plaqueamento

Alíquotas de 0,3mL, 0,3mL, 0,3mL e 0,1mL da amostra não diluída foram pipetadas, distribuídas e espalhadas na superfície de placas contendo o meio Dicloran Rosa de Bengala (DRBC/DIFCO)<sup>4</sup>, perfazendo 1mL da amostra, em duplicatas. As placas foram incubadas, sem inverter a posição, por 5 dias à 25°C.

### 2.2 Contagem de bolores e leveduras após filtração em membranas

Alíquotas de 5mL foram filtradas utilizando-se o Sistema Microfil da Millipore composto de: Manifold em aço inox 308, copos descartáveis de polipropileno e membranas de poro 0,80µm, específica para fungos. Este conjunto de filtração foi ligado a uma bomba de vácuo.

Foram utilizadas placas de Petri estéreis e descartáveis de 47mm em poliestireno, contendo o meio DRBC (DIFCO)<sup>12</sup> e M-Green Yeast and Mold Broth com adição de ágar (BBL)<sup>9</sup>. As placas foram incubadas, sem inverter a posição, por 5 dias à 25°C.

### 2.3 Isolamento, Enumeração e Identificação dos fungos

Cada colônia de fungos foi contada, isolada e identificada de acordo com Samson et al (1996)<sup>10</sup> e Pitt & Hocking (1999)<sup>8</sup>.

As colônias de leveduras foram identificadas pela taxonomia clássica<sup>8</sup> e também com kits Mini Api ID 32D (BioMérieux).

### 2.4 Número Mais Provável (NMP) de coliformes<sup>7</sup>

Teste presuntivo: Alíquotas de 10 mL foram inoculadas em 5 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) concentração dupla, com tubos de Durhan. O pH das amostras foi neutralizado sempre que necessário usando-se NaOH 0,1N. Os tubos foram incubados à 35°C por 24 – 48 horas.

Teste confirmativo: Os tubos que apresentaram gás foram repicados para Caldo Verde Brilhante Bile (VB) concentração simples, com tubos de Durhan. Os tubos foram incubados à 35°C por 48 horas.

A reação foi considerada positiva quando ocorreu a presença de bolhas no interior dos tubos de Durhan.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectadas bactérias do grupo coliforme (ausência em 50 mL da amostra) em todas as amostras de refrigerantes analisadas. Destas, 13% foram condenadas por apresentarem contagens de bolores e leveduras superiores a 20 UFC/mL (Portaria 451/97 do MS/SVS - ítem XII inciso a)<sup>1</sup>.

Foram analisadas 46 amostras de refrigerantes de frutas, 43 de guaraná e 11 de cola. De um total de 13 amostras condenadas, 6 (46,2%) foram de guaraná e 7 (53,8%) de frutas.

Das amostras condenadas 7,7% foram produzidas em indústrias consideradas regulares, 69,2% ruins e 23,1% precárias.

Em relação às duas metodologias utilizadas para enumeração de bolores e leveduras observou-se que o percentual de condenação das 100 amostras analisadas foi igual quando se utilizou os meios DRBC (técnica do espalhamento em superfície) e M-Green Yeast and Mold (técnica de filtração em membrana). Entretanto, neste trabalho o meio DRBC apresentou menores populações em relação ao meio M-Green Yeast and Mold, quando foi utilizada a técnica de filtração em membrana.

Este método é utilizado em análises de rotina pelas grandes indústrias de bebidas e permite a detecção de pequeno número de microrganismos, por concentração da amostra<sup>5</sup>.

Taniwaki et al. (1999)<sup>13</sup> observaram que as populações obtidas com o meio DRBC utilizando-se a técnica do espalhamento em superfície foram maiores quando comparadas com as populações encontradas em outros meios tais como Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG 18), Ágar Batata Dextrose Acidificado (APDA), Ágar Batata Dextrose Antibióticos (PDAA), Ágar Sabouraud Dextrose Antibióticos (SDAA), Ágar Extrato de Malte Antibióticos (MEAA) e Petrifilm YM. Esta técnica propicia a maior exposição das células ao oxigênio atmosférico e evita o estresse das mesmas pelo ágar liqüefeito após aquecimento.

As indústrias de refrigerantes vêm utilizando o meio M-Green Yeast and Mold Broth com a técnica de membrana filtrante para detecção de fungos em bebidas contendo açúcar, xaropes, frutas cítricas, carbonatadas<sup>9</sup>.

As amostras que apresentaram condições higiênicas insatisfatórias, com base na Portaria nº 451/97 da Vigilância Sanitária, foram condenadas. Destas, 46,2% apresentaram leveduras, 30,8% leveduras e fungos filamentosos, e 23% fungos filamentosos. Estes resultados estão de acordo com Pitt & Hocking (1999)<sup>8</sup> que afirmam que as leveduras são deteriorantes associados a alimentos ácidos líquidos engarrafados, com disponibilidade de oxigênio reduzida e diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>, no interior dos quais os microrganismos unicelulares se dispersam mais facilmente.

As leveduras mais encontradas foram *Zygosacharomyces rouxii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, e *Criptococcus albidus*. A presença de *Zygosacharomyces rouxii* dentre as leveduras

isoladas é pertinente pois ela é considerada uma levedura osmofílica e está frequentemente associada à deterioração de alimentos processados. É essencial a manutenção de um rigoroso programa de limpeza e sanitização da linha de produção de bebidas porque esta levedura pode desenvolver continuamente nos equipamentos e sua presença no produto só será detectada depois de um período considerável de tempo (Pitt & Hocking, 1999)<sup>8</sup>.

Os bolores mais encontrados foram *Cladosporium sp.*, *Curvularia sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *Penicillium commune*, *P. decumbens*, *P. citrinum* e *P. glabrum*. A presença do fungo xerofílico *Eurotium amstelodami* também foi observada. O *Penicillium commune* possui habilidade para crescer em atmosferas com baixa concentração de O<sub>2</sub>, alta concentração de CO<sub>2</sub> ou ambos. Este fungo é capaz de produzir, em diversos substratos, várias micotoxinas incluindo ácido ciclopiazônico, ácido ciclopaldico e rugulovasinas<sup>3,11</sup>.

A presença de micélio visível, substância estranha à constituição normal dos refrigerantes, independente de ser passível de germinação ou multiplicação, já pode se constituir uma razão para a rejeição destes produtos. A constatação dos fungos em alimentos é indicativa de má qualidade da matéria prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento. É importante salientar que alguns bolores e leveduras provenientes de alimentos podem causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos e reações alérgicas em indivíduos saudáveis<sup>6</sup>.

## CONCLUSÃO

A partir de 2 de janeiro de 2001 passou a vigorar a resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>2</sup> que excluiu o parâmetro contagem de bolores e leveduras (20 UFC/mL) das análises de refrigerantes. Entretanto, o parâmetro coliformes à 35°C/50 mL (Ausência) permanece. A presença de coliformes totais, bolores e leveduras em número superior àqueles estabelecidos pela Portaria 451/97 em alimentos destinados ao consumo humano, evidencia práticas de higiene aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos<sup>1</sup>. Tendo em vista que não foi detectada a presença de coliformes e sim de bolores e leveduras, a retirada deste último parâmetro da legislação dificulta o monitoramento das indústrias de refrigerantes pelos órgãos de fiscalização, impedindo assim uma ação efetiva por parte das Vigilâncias Sanitárias.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Saúde e ao CNPq pelo auxílio financeiro, ao Dr Carlos Rosa (ICB/UFMG) pelo apoio técnico na classificação das leveduras e à BioMérieux pelo fornecimento dos kits Mini Api ID 32C.

Morais, V. A. D. et al. - Microbiological evaluation of soft drink samples marketed in the state of Minas Gerais. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 1 - 4, 2003.

**ABSTRACT.** The aim of this study was to evaluate the hygienic and sanitary quality of soft drinks of different commercial brands, flavours cola, guaraná and fruits. The samples (2 liters Pet) were randomly collected in commercial establishments by the Inspection Service (VISA/MG). Two methodologies were used to enumerate viable fungi in beverages (APHA, 1992). The first one was the surface spread-plate technique using Dicloran Rose Bengal Chloranphenicol medium, and the second one was the membrane filter technique, and media: M-Green Yeast and Mold and DRBC medium . 13% of the soft drink samples showed levels of yeast and mold higher than 20 CFU/mL being classified as unacceptable because of its hygienic conditions (Portaria 451/97 of MS/SVS – item XII-a). 46.2% of these samples presented yeasts, 30% yeasts and molds, and 23% molds. Coliforms were not detected in the samples. 92.3% of the unacceptable samples were provenient from industries classified as bad or precarious according to their premises.

**KEY WORDS: Soft drinks, Yeast, Mold and Coliforms**

#### REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 da Vigilância Sanitária – Diário Oficial da União, Brasília. nº 182 – Seção 1, p. 21005-21012, de 22 de setembro de 1997.
2. Brasil. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 - Diário Oficial da União, Brasília. Seção 1, p. 45 – 53, de 10 de janeiro de 2001. [Agência Nacional de Vigilância Sanitária].
3. Frisvad, J. C. Fungal species and their production of mycotoxins. In: Samson, R. A., editor. **Introduction to Food-borne Fungi**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1988. p. 239-49.
4. King, A. D., Hocking, A. D., Pitt, J. I. Dichloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, 37: 959-64, 1979.
5. Koburger, J. A. & Norden, A. R. Fungi in Foods. **J. Milk Food Technol.**, 38: 745-6, 1975.
6. Mislivec, P. B.; Beuchat, L. R.; Cousin, M. A. Yeasts and Molds. In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F., editor. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: APHA; 1992. p. 239 – 49.
7. Peeler, J. I.; Houghtby, G. A.; Raimoser, A. P. The Most Probable Number Technique. In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F., editor. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: APHA; 1992. p. 105 – 20.
8. Pitt, J. I. & Hocking, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed. Maryland: Aspen Publishers Inc.; 1999. 593 p.
9. Power, D. A. & McCuen, P. J. Manual of BBL Products and Laboratory Procedures. 6.ed. Becton Dickinson Microbiology Systems, 1988.
10. Samson, R. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., King, A. D. **Modern Methods in Food Mycology**. Amsterdam: Elsevier; 1992. 388 p.
11. Scussel, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular; 1998. 144p.
12. Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Sucos e Refrigerantes**. São Paulo: ITAL; 1997. 154p.
13. Taniwaki, M. H., Iamanaka, B. T., Banhe, A. A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. **J. Food Mycol.**, 2: 291-302, 1999. Recebido em 02/01/2002; Aprovado em 13

## Perfil bacteriológico da tuberculose pulmonar na região de Campinas e das Diretorias Regionais de Saúde XII, XV e XX-1999/2000

Bacteriologic profile of lung tuberculosis in the Campinas  
Region and XII, XV and XX Health Regional Department, -1999/2000

Dalva C. G. AILY<sup>1\*</sup>  
Maria de Lourdes M. SHIKAMA<sup>2</sup>  
Maria Lúcia F. OLIVEIRA<sup>1</sup>  
Rosângela M. SILVA<sup>1</sup>

RIALA6/931

Aily, D.C.G. et al - Perfil Bacteriológico da Tuberculose Pulmonar na Região de Campinas e das DIRs XII, XV e XX - 1999/2000. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 5 - 10 ,2003

**RESUMO.** Com o objetivo de avaliar o diagnóstico bacteriológico e controle de tratamento da tuberculose, os autores analisaram, nos anos de 1999 e 2000, os exames processados pelo Instituto Adolfo Lutz de Campinas e laboratórios de sua abrangência das Diretorias Regionais de Saúde (DIR)- XII, XV e XX, que atendem 93 municípios. Neste período foram realizados 53.341 baciloscopias, em 3.781 (7,1%) foram detectados a presença de BAAR com positividade 4,9% para diagnóstico, 1,2% para controle de tratamento e 1% para o sem informação quanto ao quesito diagnóstico e ou controle de tratamento. Foram realizadas 7.603 (14,3%) culturas, havendo isolamento de micobactérias em 1.134 (14,9%) amostras, 13,2% para diagnóstico, 1,4% para controle de tratamento e 0,3% para o sem informação. Foram identificadas 936 cepas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 48 ao complexo *M.avium*. O perfil de sensibilidade de 381 cepas de *M. tuberculosis* demonstrou que 78,0% foram sensíveis às drogas testadas e 22,0% resistentes a pelo menos uma droga. As análises destes dados contribuem para as ações do Programa de Controle da Tuberculose, auxiliando na determinação do perfil epidemiológico da doença na região de Campinas e nas DIRs envolvidas.

**PALAVRAS-CHAVES.** Tuberculose, Bacteriologia, Diagnóstico Bacteriológico, Resistência a drogas, *Mycobacterium tuberculosis* e complexo *M.avium*.

<sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas - Área de Micobactérias

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Sorocaba - Área de Micobactérias

\* Endereço para correspondência: Rua 7, nº 226 - Rio Claro (SP) - CEP 13.500-060

e-mail: marcoailypico@ig.com.br

## INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituído pelo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*<sup>2,6</sup>. Apesar de grandes avanços tecnológicos na área diagnóstica e a existência de drogas efetivas para o tratamento, a TB persiste como um grave problema de saúde pública, principalmente devido às más condições sócio-econômicas que levam a uma queda na qualidade de vida<sup>2,13</sup>.

No Brasil foram notificados nos últimos 10 anos a média anual de 80 mil casos novos de TB, 25% destes são do Estado de São Paulo. Deste total cerca de oito mil são da forma pulmonar bacilífera, que são os responsáveis pela cadeia de transmissão, gerando novos doentes<sup>13</sup>.

O Programa de Controle da Tuberculose (PCT) tem como meta a busca ativa de casos e o tratamento subsequente, objetivando curar a maior parte das descobertas (85%), reduzindo a contagiosidade e as mortes por ela provocadas<sup>2,3</sup>.

O laboratório desempenha um importante papel no PCT, pois é o exame bacteriológico que confirma o diagnóstico e identifica os pacientes bacilíferos, que são fonte de transmissão da doença. Além disso, exames complementares de cultura e teste de sensibilidade às drogas permitem identificação de casos paucibacilares e cepas resistentes às drogas<sup>2,11</sup>.

A rede de laboratórios das Diretorias Regionais de Saúde (DIRs) XII, XV e XX é constituída por dois laboratórios regionais, oito hospitalares e vinte e dois locais. De acordo com as atribuições de cada nível laboratorial as baciloscopias são realizadas pelos laboratórios locais e hospitalares e, os exames complementares de cultura, identificação e teste de sensibilidade às drogas, pelos laboratórios regionais e central.

Diante do exposto, os autores avaliaram o perfil bacteriológico da TB na região de Campinas, incluindo as DIRs XII, XV e XX, nos anos de 1999 e 2000.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Nos anos de 1999 e 2000, foram examinadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) - Laboratório I de Campinas e outros 32 laboratórios de abrangência das DIRs XII, XV e XX (Anexo 1), 53.341 amostras de escarro, para diagnóstico ou controle de tratamento da TB pulmonar, provenientes de pacientes atendidos nos centros de saúde, ambulatórios e hospitais da região.

Os exames de baciloscopia e cultura foram realizados de acordo com as normas do PCT<sup>2</sup>. Para cada amostra de escarro foi feito um esfregaço e, o mesmo, corado pelo método de Ziehl-Neelsen. As culturas foram executadas em quatro laboratórios: IAL de Campinas e de Rio Claro, municipal de Jundiá e pelo

laboratório da Universidade de Campinas. Dois métodos foram empregados para o isolamento de micobactérias. Em 1999 as amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff e semeadas em meio de cultura de Lowenstein-Jensen (L-J) e L-J acrescido de 500 µg/mL de ácido p-nitrobenzóico (PNB)<sup>2,6</sup>. A partir do ano 2000, as amostras foram descontaminadas pelo método do Swab e semeadas em meio de Ogawa-Kudoh (O-K) e O-K acrescido de 500 µg/mL de PNB<sup>5,8,10</sup>. As culturas que apresentaram crescimento de bacilos álcool ácido resistentes nos meios contendo PNB foram classificadas como micobactérias não tuberculosas (MNT). Estas culturas foram encaminhadas ao laboratório do IAL de São Paulo para a identificação de espécies; aquelas que não cresceram em meios contendo PNB foram classificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e submetidas ao teste de sensibilidade às drogas utilizadas no esquema terapêutico, no IAL regional de Sorocaba pelo método das proporções ou IAL Central, pelo método da razão de resistência<sup>9,14</sup>, de acordo com os critérios do PCT: falência de tratamento, retratamento, pacientes com HIV positivo e contactante de caso de TB resistente.

## RESULTADOS

No período estudado foram realizadas 53.341 baciloscopias; 20.858 (39,1%) no ano de 1999 e 32.483 (60,9%) no ano de 2000. Foram obtidas 3.781 (7,1%) amostras positivas, 4,9% para diagnóstico, 1,2% para controle de tratamento e 1,0% sem informação (Tabela 1).

Do total das amostras, foram realizadas 7.603 (14,3%) culturas, 1997 (26,3%) em 1999 e 5.606 (73,7%) em 2000. Houve isolamento de micobactérias em 1.134 amostras (14,9%), sendo 13,2% para diagnóstico, 1,4% para controle de tratamento e 0,3% sem informação (Tabela 2).

Foram identificadas 936 (82,5%) cepas pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e 48 (3,7%) ao complexo *M. avium* e 84 (7,4%) como outras espécies (Tabela 3).

A avaliação da sensibilidade às drogas de 381 cepas de *M. tuberculosis* demonstrou que 296 (78,0%) destas foram sensíveis às drogas testadas e 85 (22,0%) foram resistentes a uma ou mais drogas do esquema preconizado para o tratamento de TB (Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina, Pirazinamida e Etambutol). A Tabela 4 indica o perfil de resistência das 131 cepas de *M. tuberculosis* isoladas no ano de 1999. No ano de 2000, 250 culturas de *M. tuberculosis* foram submetidas ao teste de sensibilidade às drogas, 55 (22,0%) apresentaram resistência a pelo menos uma das drogas do esquema terapêutico. Por região observou-se: DIR XII – total de 224 cepas e 49 (22,0%) resistentes; DIR XV – total de 15 cepas e 5 (33,3%) resistentes e, DIR XX – total de 11 cepas e 1 (9,1%) resistente.

**Tabela 1.** Distribuição do número de baciloscopias segundo informação quanto ao diagnóstico/controlado de tratamento. DIRs XII, XV e XX. Anos de 1999 e 2000

PROCEDÊNCIA	ANO	Nº TOTAL	Nº (%) POSITIVAS	BACILOSCOPIAS					
				DIAGNÓSTICO		CONTROLE DE TRATAMENTO		SEM INFORMAÇÃO	
				Nº TOTAL	N (%) POSIT.	Nº TOTAL	N (%) POSIT.	Nº TOTAL	N (%) POSIT.
DIR XII	1999	14.091	1.346 (9,5)	9.547	794 (8,3)	1.263	283 (22,4)	3.281	269 (8,2)
	2000	22.186	1.271 (5,7)	21.115	1.083 (5,1)	1.071	188 (17,5)	-	-
DIR XV	1999	3.587	352 (9,8)	2.445	200 (8,2)	285	59 (21,0)	857	93 (10,8)
	2000	4.713	460 (9,8)	3.360	312 (9,3)	290	63 (22,0)	763	85 (11,1)
DIR XX	1999	3.180	198 (6,2)	1.649	102 (6,2)	189	27 (14,3)	1.342	69 (5,1)
	2000	5.584	152 (2,7)	5.335	131 (2,5)	207	19 (9,2)	42	4 (9,5)
<b>TOTAL</b>	<b>1999</b>	<b>20.858</b>	<b>1.896 (9,0)</b>	<b>13.641</b>	<b>1.096 (8,0)</b>	<b>1.737</b>	<b>369 (21,2)</b>	<b>5.480</b>	<b>431 (7,9)</b>
	<b>2000</b>	<b>32.483</b>	<b>1.885 (5,8)</b>	<b>30.110</b>	<b>1.526 (5,1)</b>	<b>1.568</b>	<b>270 (17,4)</b>	<b>805</b>	<b>89 (11,1)</b>

**Tabela 2.** Distribuição do número de culturas segundo informação quanto ao diagnóstico/controlado de tratamento. DIRs XII, XV e XX. Anos de 1999 e 2000

PROCEDÊNCIA	ANO	Nº TOTAL	Nº (%) CULTURAS POSITIVAS	CULTURAS					
				DIAGNÓSTICO		CONTROLE DE TRATAMENTO		SEM INFORMAÇÃO	
				Nº TOTAL	Nº(%) POSIT.	Nº TOTAL	Nº(%) POSIT.	Nº TOTAL	Nº(%) POSIT.
DIR XII	1999	1.665	264 (15,8)	1.360	206 (15,1)	188	38 (20,2)	95	20 (21,0)
	2000	4.840	720 (14,9)	4.550	672 (14,7)	228	48 (21,0)	-	-
DIR XV	1999	99	17 (17,2)	56	11 (19,6)	7	4 (57,1)	34	2 (5,9)
	2000	553	57 (10,3)	483	52 (10,8)	38	5 (13,1)	-	-
DIR XX	1999	233	51 (21,9)	171	42 (24,6)	12	6 (50,0)	32	3 (9,4)
	2000	213	25 (11,7)	189	21 (11,1)	16	4 (25,0)	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>1999</b>	<b>1.997</b>	<b>332 (16,6)</b>	<b>1.587</b>	<b>259 (16,3)</b>	<b>207</b>	<b>48 (23,2)</b>	<b>161</b>	<b>25 (15,5)</b>
	<b>2000</b>	<b>5.606</b>	<b>802 (14,3)</b>	<b>5.222</b>	<b>745 (14,3)</b>	<b>282</b>	<b>57 (20,2)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Tabela 3.** Distribuição das espécies identificadas, de acordo com ano e DIR de isolamento

PROCEDÊNCIA	ANO	Nº TOTAL	Nº (%)		DAS *	ESPÉCIES NÃO IDENTIFICADAS	CONTAMINADA
			COMPLEXO M. tuberculosis	COMPLEXO M. avium			
DIR XII	1999	310	269 (86,7)	6 (1,9)	10 (3,2)	3 (1,0)	22 (7,1)
	2000	687	552 (80,3)	33 (4,8)	69 (10,0)	16 (2,3)	17 (2,5)
DIR XV	1999	16	16 (100)	-	-	-	-
	2000	57	47 (82,5)	2 (3,5)	1 (1,7)	3 (5,2)	4 (7,0)
DIR XX	1999	33	31 (94,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	-	-
	2000	31	21 (68,0)	6 (19,3)	3 (9,6)	1 (3,2)	-
<b>TOTAL</b>	<b>1999</b>	<b>359</b>	<b>316 (88,0)</b>	<b>7 (1,9)</b>	<b>11 (3,0)</b>	<b>3 (0,8)</b>	<b>22 (6,1)</b>
	<b>2000</b>	<b>775</b>	<b>620 (80,0)</b>	<b>41 (5,3)</b>	<b>73 (9,4)</b>	<b>20 (2,6)</b>	<b>21 (2,7)</b>

\* Outros: *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. chelonae*, *M. kansasii*

**Tabela 4.** Perfil de resistência às drogas de 131 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas no ano de 1999

PERFIL DE RESISTÊNCIA	Nº Total (n=131)	Nº (%) DE CEPAS PROVENIENTES DA		
		DIR XII (n=108)	DIR XV (n=6)	DIR XX (n=17)
<b>SENSÍVEIS</b>	101 (77,0)	83 (76,8)	4 (66,6)	14 (82,3)
<b>MONORESISTENTES</b>	<b>13 (10,0)</b>	11 (10,2)	1 (16,7)	1 (5,9)
INH	5	4 (3,7)	-	1 (5,9)
RFP	3	2 (1,8)	1 (16,7)	-
SM	5	5 (4,6)	-	-
<b>MULTIRESISTENTES</b>	<b>16 (12,2)</b>	13 (12,7)	1 (16,7)	2 (11,8)
INH + RFP	8	6 (5,5)	1 (16,7)	1 (5,9)
INH + RFP + PZA	2	1 (0,9)	-	1 (5,9)
INH + RFP + SM	2	2 (1,8)	-	-
INH + RFP + EMB	3	3 (2,8)	-	-
INH + RFP + PZA + EMB	1	1 (0,9)	-	-
<b>OUTRO PERFIL</b>	<b>1 (0,8)</b>	1 (0,9)	-	-
INH + SM	1	1 (0,9)	-	-

INH – Isoniazida, RFP – Rifampicina, SM – Estreptomicina, EMB – Etambutol, PZA – Pirazinamida.

## ANEXO 1

Relação dos Laboratórios que realizaram baciloskopias para este estudo:

Instituto Adolfo Lutz - Regional de Campinas e laboratórios de sua abrangência, a saber:

### DIR XII:

Laboratório Municipal de Campinas  
Laboratório do Hospital Municipal Mário Gatti  
Laboratório do Hospital Municipal Celso Pierro  
Laboratório do Hospital das Clínicas da Unicamp  
Laboratório do Ambulatório de MI de Jundiá  
Laboratório Local de Bragança Paulista  
Laboratórios Municipais de: Amparo, Socorro, Atibaia, Cosmópolis, Indaiatuba, Valinhos, Pedreira  
Laboratório dos Hospitais Municipais de Paulínia, Americana e Santa Bárbara D'Oeste

### DIR XX:

Laboratórios Municipais de São João Boa Vista, Mogi-Mirim, Itapira, Espírito Santo do Pinhal e São José do Rio Pardo  
Laboratório Local de Casa Branca.

Instituto Adolfo Lutz – Regional de Rio Claro e laboratórios de sua abrangência, a saber:

### DIR XV:

Laboratórios Municipais de Piracicaba, Limeira, Araras, Pirassununga, Capivari e Conchal  
Laboratório da Irmandade da Santa Casa de Leme  
IPACE – Instituto de Patologia Clínica de Limeira.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A baciloscopia é o método de escolha para o diagnóstico da TB em regiões de alta incidência, por demonstrar a presença do agente etiológico da doença e identificar os casos bacilíferos para serem tratados, acrescido de seu baixo custo e simplicidade na execução. Apesar da baciloscopia representar o principal recurso para o diagnóstico da TB a cultura é mais sensível e permite maior cobertura diagnóstica, além de possibilitar o isolamento para a identificação das espécies e o estudo sobre resistência às drogas para medidas de controle da doença.<sup>2,6,11</sup>

Ainda que na região de abrangência das DIRs XII, XV e XX, com uma população estimada em aproximadamente 5.214.300 habitantes, a meta de baciloscopia (1% da população) seja de 52.143 exames/ano, o presente estudo demonstrou a realização de 20.858 baciloskopias em 1999 e 32.483 em 2000. Embora tenha havido um acréscimo de 60% no ano de 2000, há ainda a necessidade de se aumentar a busca ativa nessa região.

Nas DIRs XII e XX observou-se diminuição da positividade da baciloscopia, provavelmente em razão do aumento da busca ativa nessa região. Por outro lado, na DIR XV observou-se acréscimo de 1,1% na positividade e portanto, parece evidente a necessidade da ampliação da busca ativa nessa área (Tabela 1).

O aumento de 2,8% do número de culturas realizadas foi possível com a implantação do método do Swab, que passou a ser utilizado após um estudo piloto onde se obteve resultados similares à técnica tradicional – método de Petroff, dados não publicados. Além da facilidade em sua execução, esse método reduz a manipulação das amostras, elimina a utilização de equipamentos que produzem aerossóis e diminui a contaminação ambiental e, conseqüentemente, o risco para os técnicos de laboratório.

A identificação das culturas positivas demonstrou que 82,5% são do complexo *M. tuberculosis* e 17,5% são MNTs. Com a implementação da cultura observou-se o aumento do isolamento de MNTs e este foi mais acentuado na DIR XII. Este acréscimo, principalmente do complexo *M. avium*, pode ser reflexo da existência em maior número nesta região de centros de atendimentos de pacientes HIV positivo. Ressaltamos contudo, que estes dados demonstram a frequência de outras espécies de micobactérias, dentre as culturas realizadas nesta região, porém serão necessários outros estudos para verificação da importância clínica destes isolamentos<sup>1</sup>.

Neste estudo, foi possível analisar, com detalhes, somente os resultados dos testes de sensibilidade às drogas das amostras processadas no ano de 1999. Foi encontrada uma taxa de 12,2% de pacientes multidrogaresistentes. Embora não seja possível comparar estes dados com estudos publicados no país, pois os testes foram solicitados mediante uma suspeita de resistência, estes resultados são preocupantes e mostram a existência do problema na região.

Nas cepas encontradas no ano 2000 a resistência global foi semelhante a observada em 1999, 22,0%.

As taxas de resistência observadas são um alerta para o problema da TB multiresistente e sugerem que novos estudos com avaliação populacional e amostragem definida são essenciais para a análise em casos de diagnóstico e de controle de tratamento.

Os resultados deste estudo indicam a necessidade de se aumentar a busca ativa de casos na região e medida de controle, como tratamento supervisionado, para reduzir as taxas de resistência às drogas nas regiões estudadas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de todos os funcionários da Saúde que, direta ou indiretamente, participam do Programa de Controle da Tuberculose.



Aily, D.C.G. et al – Bacteriologic profile of lung tuberculosis in the Campinas Region and XII, XV and XX Health Regional Department,-1999/2000. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 62(1): 5 - 10 ,2003.

**ABSTRACT.** With the purpose of evaluating the bacteriological diagnosis and the tuberculosis treatment control, the authors analyzed, in the years of 1999/2000, the tests processed by the Adolfo Lutz Institute in Campinas (SP), Health Regional Department (DIRS) and laboratories related to it from XII, XV and XX, which serve 93 towns. During that period 53.341 samples were undertaken, 3.781 (7,1%) detected the presence of BAAR with positiveness of 4,9% for diagnosis, 1,2% for treatment control and 1,0% for the ones without information regarding the diagnosis item or treatment control. 7.603(14,3%) cultures were grown, with isolation of micobacteria taking place in 1.134 (14,9%); 13,2% for diagnosis, 1,4% for treatment control and 0,3% for the ones lacking information. 936 heathers belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex and 48 belonging do *M. avium* complex were identified. The profile of sensitiveness of 381 heathers of *M. tuberculosis* showed that 78% were sensitive to tested drugs used and 22% resisted at least one drug. That data analyses have contributed to the realizations of the Tuberculosis Control Program, helping to determining the epidemiological profile of the illness in the Campinas region and involved DIRs.

**KEY WORDS.** Tuberculosis, Bacteriological Diagnosis, Multidrug resistance, *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. avium* complex.

## REFERÊNCIAS

1. Barreto, A.M.W.; Campos, C.E.D. – Micobactérias “não Tuberculosas” no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. 8; 23-32, 2000.
2. BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Helio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2 ed., Rio de Janeiro, 1994.
3. BRASIL. Ministério da Saúde.-FNG/CENEPI/CNPS/ Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. X Conferência Nacional de Saúde, 1996-Vol.04.
4. Centro Panamericano de Zoonosis. **Bacteriologia de la Tuberculosas Humana y animal** – série de monografias científicas y técnicas – CPZ –11-1979.
5. Coelho, A.G.V. et al - Evaluation of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobactéria. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**. 58; 57-61, 1999.
6. David, H.L.; Brum, L.; Prieto, E. **Manual de micobacteriologia em Saúde Pública Princípios e métodos** . Instituto Higiene e Medicina Tropical . Lab. Micobactérias. Lisboa .1994.
7. David, H.L.; Frebault, V.L.; Thorrel, M.F. **Methodes de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique**. Institut Pasteur. Paris. 1988.
8. Filho,A.F.-Emprego da Técnica da cultura simplificada de Kudoh & Kudoh (1974) para diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar em Saúde Pública. São Paulo, 1996 (Tese de doutorado, Faculdade de Saúde Pública da U.S.P.).
9. Kent, P.T.; Kubica, G.P. –Public Health Mycobacteriology. **A guide for the Level III Laboratory**. Centers for Control, Atlanta, p. 207, 1985.
10. Kudoh ; Kudoh, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bull Who**, 51:71-82-1974.
11. Meyer, L.; David, H.L. Centre Nacional de reference pour la tuberculose e les Mycobacteries. **Mycobacteriologie en Sante Publique**. Institut Pasteur . Paris 1980.
12. Organización Panamericana de la Salud – **Manual de Normas y procedimientos técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis**. Parte I. La Muestra. El Examen Microscópico. Nota técnica nº 26/Rev.1, Martinez, 1988.
13. São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Informe Técnico – Campanha Estadual de Busca de Casos de Tuberculose. Alerta TB/1998.
14. Wayne, L.G. et al. High reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus Mycobacterium : Tests for niacin and catalyses and for resistance to Isoniazid, Thiophene 2-carboxylic acid hydrazide by droxylamino and p-nitrobenzoite. **Inst. Syst. Bacteriol**. 26; 311-18, 1976.

Recebido em 18/04/2002 ; Aprovado em 06/02/2003

## Avaliação de metodologia para a detecção de resíduos de terra diatomácea em grãos de trigo e farinha\*\*

### Evaluation of the methodology for detection of diatomaceous earth residue (de) in wheat grain and flour

Márcia B. ATUI<sup>1\*</sup>  
Flávio A. LAZZARI<sup>2</sup>  
Sonia M. N. LAZZARI<sup>3</sup>

RIALA6/932

Atui, M. B.; Lazzari, F. A. e Lazzari, S. M. N. - Avaliação de metodologia para a detecção de resíduos de terra diatomácea em grãos de trigo e farinha\*\*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 11 - 16 ,2003

**RESUMO.** O uso de terra diatomácea e de outros pós inertes vem se tornando uma prática comum no controle de insetos de produtos armazenados. Elas podem ser usadas em associação com fumigantes, criando uma barreira física que impede a infestação das partes inferiores e superiores da massa de grãos com insetos vindos de fora da estrutura. A existência de uma metodologia que permita a detecção de pós inertes, no caso, terra diatomácea, em grãos é de grande importância para a indústria e para os laboratórios oficiais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia para detectar a presença de terra diatomácea em grãos de trigo. Para isto, foram tomadas amostras de 1 Kg de grãos de trigo tratados com diferentes dosagens de terra diatomácea: 250 g/t; 500 g/t; 750 g/t; 1000 g/t; 2000 g/t; 4000 g/t; 6000 g/t; 8000 g/t; 10000 g/t. O método proposto utilizou água filtrada para lavagem dos grãos e extração das algas diatomáceas em substituição ao álcool a 95% utilizado no método original. Foram recuperadas carapaças/fragmentos de algas diatomáceas em todas as amostras analisadas, mesmo naquelas tratadas com pequenas quantidades de terras diatomáceas. O método proposto mostrou-se adequado para avaliar a presença de partículas de algas diatomáceas e sugere-se ser adotado como método oficial.

**PALAVRAS CHAVES.** pós inertes, algas diatomáceas, trigo.

#### INTRODUÇÃO

O uso de terra diatomácea (sedimento de carapaças de algas diatomáceas) e de outros pós inertes vem se tornando uma alternativa para o controle de insetos de grãos armazenados em vários países do mundo (Austrália, Brasil, Canadá e Estados Unidos). Trabalhos técnicos têm demonstrado a eficiência de

formulações de terra diatomácea na dosagem de 250 a 1000 g/t, dependendo do tipo de grãos, no controle das diversas espécies de insetos de grãos armazenados, tais como *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae), *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) e *Cryptolestes* spp. (Coleoptera: Cucujidae)<sup>2,3,4,5,8,9,10,11,12,13,14,16,18</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, SP, Seção de Microscopia Alimentar.

<sup>2,3</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

\*Endereço para correspondência: Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, Seção de Microscopia Alimentar, Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902, São Paulo, SP.

\*\*Parte da tese de doutorado, apresentada pela primeira autora, a Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia da Universidade Federal do Paraná.

Existem aproximadamente 250 gêneros e 8.000 espécies de algas diatomáceas, cujas carapaças ricas em sílica foram sendo depositadas há mais ou menos 20 a 80 milhões de anos no fundo de oceanos e lagos, formando camadas que podem ter de poucos centímetros a centenas de metros. As camadas depositadas principalmente em águas marinhas são extraídas e trituradas formando um pó fino semelhante a talco que é utilizado para o controle de insetos em produtos armazenados, cujas partículas podem ter tamanho variando entre 7 a 15  $\mu\text{m}$ <sup>7,17</sup>.

As partículas de terra diatomácea e de outros pós inertes causam danos à cutícula dos insetos através da adsorção da cera da epicutícula e abrasão da cutícula, tornando-a permeável à água e promovendo a morte por dessecação<sup>7</sup>.

O uso de formulações de terra diatomácea no controle de insetos de grãos armazenados tende a se tornar muito comum em regiões de clima seco devido a melhoria de sua eficiência. Controlam eficazmente insetos em cereais e feijão. Podem ser usadas em associação com fumigantes, criando uma barreira física que impede a infestação das partes inferiores e superiores da massa de grãos com insetos vindos de fora da estrutura. A atividade prolongada, mais a incapacidade dos insetos de desenvolverem resistência aos pós inertes os tornam altamente competitivos para o controle de insetos de grãos armazenados, permitindo sua conservação quase que indefinidamente. Também são inócuos ao homem e animais domésticos.

A existência de uma metodologia que permita a detecção de pós inertes, no caso, terra diatomácea, em grãos é de grande importância para a indústria e para os laboratórios oficiais responsáveis pela emissão de certificados de sanidade. A aplicação de formulações de terra diatomácea em grãos inteiros de trigo, triticale, cevada, aveia, milho e feijão deixa os mesmos com aparência fosca, esbranquiçada, sem seu brilho natural. Grãos tratados com pós inertes não apresentam riscos no seu manuseio e processamento. Entretanto, não é fácil através de avaliações visuais de qualidade saber se o produto recebeu tratamento com terra diatomácea.

A indústria pode requerer do fornecedor um certificado a fim de saber se o grão foi tratado ou não, porém, o grão não deve ser rejeitado ou penalizado no momento de sua comercialização, pois é indicativo de qualidade e ausência de resíduos de inseticidas químicos.

Assim, a existência de uma metodologia que permita identificar se cargas ou mesmo lotes de grãos foram tratados com pós inertes representa um avanço no controle de insetos de grãos armazenados. O objetivo desta pesquisa é, portanto, desenvolver uma metodologia que permita a detecção de resíduos de terra diatomácea em grãos de trigo e farinha e que possa ser usada pelos laboratórios oficiais como referência para os testes de qualidade.

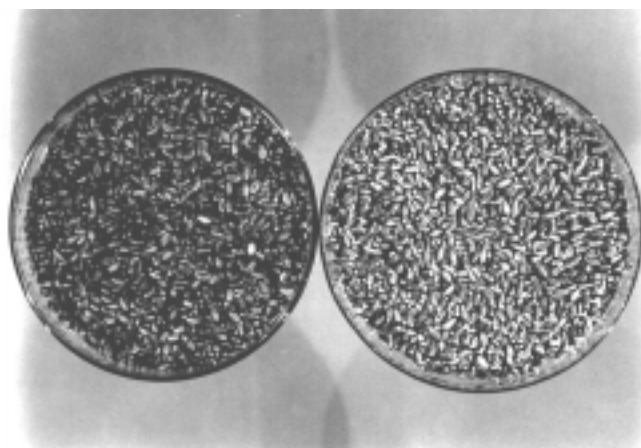
## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo das amostras de grãos de trigo com terra diatomácea

Foram tomadas amostras de 1 Kg de grãos de trigo tratados com diferentes dosagens de terra diatomácea (Insecto<sup>®</sup>). Esta formulação comercial é de origem marinha, contém 86,7% de dióxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), partículas com tamanho em torno de 10  $\mu\text{m}$ , pH 6,0 e possui em sua composição 10% de aditivo alimentar, conforme Subramanyan *et al.*<sup>16</sup>. As amostras foram preparadas pela Cooperativa Agrária Mista Entre Rios Ltda. (AGRÁRIA), localizada em Guarapuava, PR, e analisadas no laboratório de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

As amostras foram tratadas com as seguintes concentrações de terra diatomácea: Amostra 1 – 250 g/t, Amostra 2 – 500 g/t, Amostra 3 – 750 g/t, Amostra 4 – 1000 g/t, Amostra 5 – 2000 g/t, Amostra 6 – 4000 g/t, Amostra 7 – 6000 g/t, Amostra 8 – 8000 g/t, Amostra 9 – 10000 g/t.

Na Figura 1 pode-se observar grãos de trigo tratados com dosagens mínima e máxima de terra diatomácea, sendo notável a quantidade de pó aderida aos grãos nesta última (10000 g/t).



**Figura 1** – Amostras de grãos de trigo tratadas com terra diatomácea, 250 g/t (à esquerda) e 10000g/t (à direita), para análise de resíduos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 2002.

### Metodologia para a análise das amostras

A princípio, adotou-se o método utilizado para avaliar a presença de algas diatomáceas nas amostras descrito por Jonhson *et al.*<sup>6</sup>, porém como não funcionou adequadamente, foram feitas modificações, conforme se segue:

### Método original

- Pesar 50 g de grãos de trigo em erlenmeyer de 300 mL;
- Adicionar 100 mL de álcool etílico a 95 % e agitar vigorosamente por 15 segundos;
- Transferir imediatamente 0,20 mL da suspensão alcoólica para uma cavidade de um prato de porcelana apropriado;
- Levar a solução alcoólica à evaporação até quase à secura;
- Adicionar 0,20 mL de um óleo adequado ao resíduo contido na cavidade do prato e misturar bem sem esmagamento. Em virtude das algas diatomáceas usadas possuírem um índice de refração de cerca de 1,45 é conveniente usar um óleo com índice de refração maior que 1,50 ou menor que 1,40, de modo que o contraste permita a sua identificação mais facilmente;
- Transferir uma gota do material óleo-resíduo para a cavidade (0,10 mL) de uma lâmina escavada, que é coberta com lamela de reticulado conveniente (placa de contagem ou de Neubauer);
- Examinar o material ao microscópio óptico com aumento de 400x para determinar a presença e contar carapaças e fragmentos das algas diatomáceas;
- Determinar o número de algas diatomáceas e seus fragmentos em 0,2 mm<sup>2</sup> da placa de contagem;

Só deverão ser contadas as algas diatomáceas e fragmentos que forem identificados pela forma ou estrutura característica;

Se, em média, duas ou mais algas diatomáceas ou fragmentos destas, forem encontrados por 0,2 mm<sup>2</sup> na placa de contagem, o resultado é considerado positivo para a presença de algas diatomáceas.

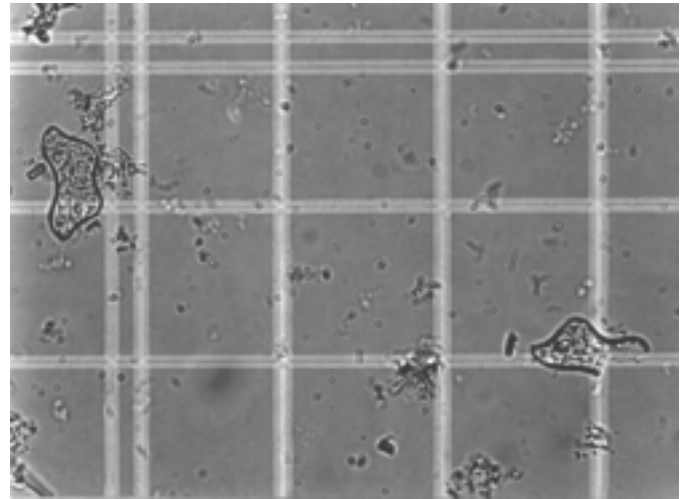
### Modificações

- Adicionar 100 mL de água filtrada em substituição ao álcool etílico 95%;
- Transferir com auxílio de uma pipeta 0,20 mL da suspensão para um vidro de relógio pequeno, em substituição a um prato de porcelana;
- Levar a evaporação em estufa a 105°C por 7 minutos ou até que a água seque;
- Adicionar 0,20 mL de óleo de cravo com índice de refração de 1,53 (26°C) e misturar bem com auxílio de um bastão de vidro sem esmagamento;
- Transferir uma gota (ou 0,02 mL) do material para uma câmara (hemocitômetro) de Neubauer, com capacidade de 0,10 mm e cobrir com a lamínula própria;
- Contar o número de algas diatomáceas e seus fragmentos em 25 campos da câmara de Neubauer medindo 0,2 mm<sup>2</sup> cada;
- Lavar a câmara de Neubauer e realizar nova contagem;
- Tirar a média dos resultados de 2 contagens.

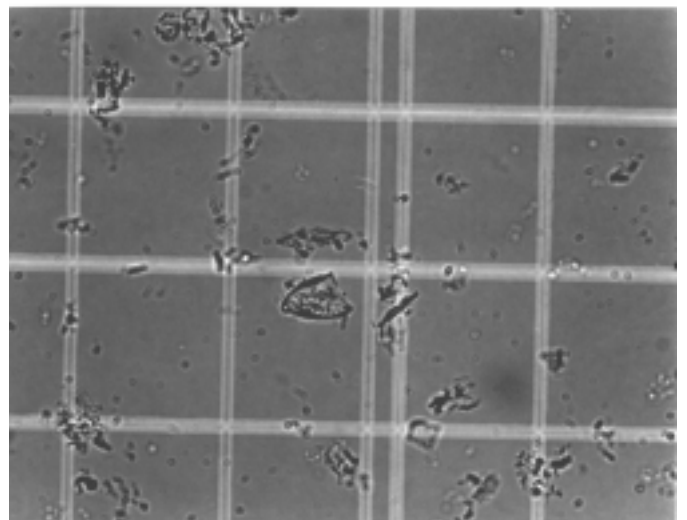
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método descrito por Johnson *et al.*<sup>6</sup> para a detecção de algas diatomáceas nas amostras de grãos de trigo, após as modificações sugeridas pelos autores deste trabalho, mostrou-se mais simples e eficiente.

As algas diatomáceas e seus fragmentos foram identificados conforme suas características típicas Andrey *et al.*<sup>1</sup> apresentadas nas Figuras 2 e 3.



**Figura 2** – Carapaça de algas diatomáceas observada em câmara de Neubauer, aumento de 4000x, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 2002.



**Figura 3** – Fragmento de carapaças de alga diatomácea na câmara de Neubauer, aumento de 4000x, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 2002.

A água atuou bem nos grãos de trigo, de modo que as algas diatomáceas e fragmentos foram recuperados em todas as amostras, mesmo naquelas que foram tratadas com pequenas quantidades de pó inerte, como pode ser observado na Tabela 1. Foram contadas as algas diatomáceas e/ou fragmentos em 50 campos da câmara de Neubauer de 0,2 mm<sup>2</sup> cada, e a média destas contagens estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Número de carapaças/fragmentos de algas diatomáceas em amostras de grãos de trigo tratadas com diferentes concentrações de terra diatomácea, com dois produtos para a extração. São Paulo, SP, 2002.

AMOSTRAS/ Concentração de terra diatomácea	Média da contagem/campo* (água filtrada)	Média da contagem/campo* (álcool etílico a 95%)
A1 - 250g/t	0,04	0
A2 - 500g/t	0,28	0,12
A3 - 750g/t	0,26	0,2
A4 - 1000g/t	0,7	0,18
A5 - 2000g/t	1,22	0,12
A6 - 4000g/t	1,62	0,08
A7 - 6000g/t	3,52	3,44
A8 - 8000g/t	4,36	0,38
A9 - 10.000g/t	5,52	2,74

\* O número expressa a média de carapaças de algas/fragmentos presentes em 50 campos de 0,2 mm<sup>2</sup> cada.

De acordo com Johnson *et al.*<sup>6</sup> e Silva e Sousa<sup>15</sup> só deveriam ser consideradas amostras positivas ou tratadas com pó inerte aquelas em que foram encontradas duas ou mais carapaças ou fragmentos/0,2 mm<sup>2</sup>. Assim, somente as amostras 7, 8, 9 seriam consideradas positivas para a presença de terra diatomácea na lavagem com água, o que corresponde a 6, 8 e 10 Kg/t, que são dosagens muita elevadas não utilizadas na prática.

De acordo com os autores deste trabalho, todas as amostras que apresentaram carapaças ou fragmentos de algas diatomáceas foram consideradas positivas, portanto 100% das amostras.

Nas amostras 1, 2 e 3 foi adicionado menos de 1Kg/t, e mesmo assim foi possível detectar uma pequena quantidade de carapaças de algas, indicando que a lavagem com água ajuda a recuperar mais material que o álcool (Tabela 1).

Quando as amostras foram lavadas com água filtrada para a extração, o número de carapaças/fragmentos recuperado foi diretamente proporcional à concentração da terra diatomácea (Tabela 1). Ao contrário, quando lavadas com álcool a 95%, a detecção foi menos sensível, indicando que a lavagem com água é mais adequada, particularmente para as baixas concentrações do produto.

Na extração com álcool o número de algas/fragmentos detectado não obedece a uma ordem crescente, pois na amostra 9 que foi tratada com maior quantidade de pó inerte (10000 g/t) a média de algas/fragmentos foi de 2,74, enquanto que as amostras 7 e 8, que foram tratadas com menor quantidade de terra diatomácea (6000 e 8000 g/t) a média de algas/fragmentos foi de 3,44 e 0,38 carapaças/campo, respectivamente, indicando resultados disparatados.

Amostras em que foram adicionadas até 4000 g/t não apresentaram contagem expressiva de algas e ou fragmentos.

O método adotado por Johnson *et al.*<sup>6</sup> e o sugerido pelos autores deste trabalho são adequados para o trigo em grão, mas não para a extração de carapaças de algas diatomáceas em farinha de trigo. Foram realizados testes com algumas amostras de farinha de trigo originadas das amostras de trigo tratadas com pó inerte utilizadas neste trabalho e testadas pelo método original de Johnson *et al.*<sup>6</sup> sem modificações. Contudo, não foi possível realizar a contagem, pois sobrou muito amido de trigo, e a câmara de Neubauer ficou com muito material dificultando a distinção entre amido e as carapaças de algas diatomáceas.

## CONCLUSÕES

A utilização de água filtrada para a extração de partículas de terra diatomácea em amostras de grãos de trigo mostrou-se mais adequada que o uso de álcool etílico a 95%. Em todas as amostras foram recuperadas algas diatomáceas, mesmo naquelas tratadas com pequenas quantidades de terra diatomácea.

O método proposto é adequado para extração de partículas de terra diatomácea em amostras de trigo tratadas com dosagem de 250 a 1000 g/t, que são dosagens usadas para o controle de insetos de grãos armazenados.

A análise de resíduos de terra diatomácea em farinha de trigo não é possível pelos métodos estudados devido a grande quantidade de amido.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao funcionário Antônio Roberto de Souza Ferreira da Seção de Fotomicrografia do Instituto Adolfo Lutz, a Adelino Poli Neto da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz e a Cooperativa Agraria Entre Rios Ltda.

Atui, M. B.; Lazzari, F. A. e Lazzari, S. M. N. - Evaluation of the methodology for detection of diatomaceous earth residue (de) in wheat grain and flour. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 11 - 16 ,2003.

**ABSTRACT.** The use of diatomaceous earth (DE) and other inert dusts has become a common practice for insect control in stored products. They may be used in association with fumigants, creating a physical barrier against infestation in the lower and upper grain mass by insects or coming from outside the storage structure. A methodology, which permits the detection of inert dust, in this case, DE - in grains is of great importance for the industry and official laboratories. Thus, the objective of this work was to develop a method for detecting the presence of DE particles on wheat kernels. Samples of 1 Kg of wheat grains were treated with different dosages of DE: 250 g/t; 500 g/t; 750 g/t; 1000 g/t; 2000 g/t; 4000 g/t; 6000 g/t; 8000 g/t; 10,000 g/t. The best results were obtained using filtered water for washing the grains and extracting the DE particles, instead of using 95% alcohol as it is prescribed in the original method. Fragments/carapaces of diatomace algae were recovered from all samples, even those treated with small amounts of the product. The proposed method proved to be adequate for detecting the presence of DE fragments/carapaces and we suggest to be adopted as an official method.

**KEY WORDS.** inert dust, diatomace earth, wheat.

#### REFERÊNCIAS

1. Andrey, D.E.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. (eds.). **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19<sup>th</sup> Ed., Published by American Public Health Association, Washington, DC, 1995, p 10-110 – 10-142, 10-143 – 10-165.
2. Arthur, F. Toxicity of diatomaceous earth to red flour beetle and confused flour beetles (Coleoptera:Tenebrionidae) Effects of temperature and relative humidity. *Journal of Economic Entomology*, 93: 526-532, 2000.
3. Dupchak, L. **Detecção de sujidades e avaliação de uma formulação de pós inertes para o controle de insetos em grãos e farinhas de trigo.** (Tese de Mestrado em Entomologia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná). Curitiba, PR, 1997, 77p.
4. Fields, P.G.; Korunic, Z. Diatomaceous earth to control stored-grain insects. In: International Congress of Entomology, 21., Foz do Iguaçu, 2000. **Abstracts...** Londrina: Embrapa Soja. Vol 2, p. 1013.
5. Fields, B. Application technology and usage patterns of diatomaceous earth in stored product protection. In: International Working Conference on Stored-product Protection 7., Beijing, 1998. **Proceedings...**, Chengdu, v.1, p.785-789.
6. Johnson, R.M.; Jackson, R.L., Anzulovic, B.M. Microscopic identification of diatoms on treated wheat. *Agronomy Journal*, 56: 241, 1964.
7. Korunic, Z. Diatomaceous earth, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Product Research*, Exeter, 34:2/3: 87-97, 1998.
8. Lorini, I.; Schneider, S. **Pragas de grãos armazenados: resultados de pesquisa.** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1994, 48p.
9. Mewis, I.; Reichmuth, C. Diatomaceous earth against the coleoptera granary weevil *Sitophilus granarius* (Curculionidae). The confused flour beetle *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae). The Mealworm *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae). In: International Working Conference on Stored-product Protection, 7., Beijing, 1998. **Proceedings...** Chengdu, v.1, p.966-973.
10. Paula, M.C.Z de. **Manutenção da Qualidade do Arroz Armazenado: Monitoramento e Controle de Insetos.** (Tese de Doutorado em Entomologia - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná). Curitiba, PR, 2001, 74p.
11. Pereira, P.R.V.S. **Contribuição para o manejo integrado de pragas de produtos armazenados.** (Tese de Doutorado em Entomologia - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná). Curitiba, PR, 1999, 62p.
12. Pinto Jr., A. **Uso de pós inertes no controle de insetos de grãos armazenados.** (Tese de Mestrado em Entomologia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná). Curitiba, PR, 1994, 62p.
13. Pinto Jr., A. **Utilização de terra diatomácea no controle de pragas de armazenamento e domissanitárias.** (Tese de Doutorado em Entomologia - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná). Curitiba, PR, 1999, 114p.

14. Rupp, M.M.M. **Detecção de sujidades e avaliação do pó inerte para o controle de insetos em cevada cervejeira e malte armazenados.** (Tese de Mestrado em Entomologia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná). Curitiba, PR, 1996, 68p.
15. Silva e Sousa, M.E. 1967. Estudo do interesse de pós inseticidas inertes no combate à pragas dos produtos armazenados. **Garcia de Lorca** (Lisboa), 15: 367-408, 1967.
16. Subramanyam, Bh.; Swason, C.L.; Madamanchi, N.; Norwood, S. Effectiveness of Insecto® a new diatomaceous earth formulation in suppressing several stored-grain insect species. In: International Working Conference on Stored-product Protection, 6., Canberra, 1994. **Proceedings...** Wallingsdorf. v. 2, p.650-659.
17. Subramanyam, Bh., Madamanchi, N.; Norwood, S., 1998. Effectiveness of Insecto applied to shelled maize against stored-product insect larvae. **Journal of Economic Entomology**, 91: 280-286, 1998.
18. Subramanyan, Bh.; Roesli, R. Inert dusts. In: Subramanyan, Bh. Hagstrum, D. W. (eds). **Alternatives to pesticides in stored-product IPM.** 1 ed. Massachusettes, Kluwer Academic Publishers Norwell, 2000, p.321-380.

Recebido em 09/10/2002 ; Aprovado em 12/06/2003

## A dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> pode ser feita a partir de amostra de hemolisado com saponina ?

Could the saponin hemolysate be used for the hemoglobin A<sub>2</sub> dosage ?

Raimundo A. G. OLIVEIRA<sup>1\*</sup>  
Fabiano P. FALCÃO<sup>1</sup>  
Maria do Socorro G. OLIVEIRA<sup>1</sup>  
Marilena OSHIRO<sup>2</sup>  
Orlando C. de O. BARRETTO<sup>3</sup>

RIALA6/933

Oliveira, R. A. G. et al - A dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> pode ser feita a partir de amostra de hemolisado com saponina ?. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 17 - 20 ,2003

**RESUMO.** A dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) é comumente feita utilizando-se como amostra solução de hemoglobina (hemolisado clássico com clorofórmio ou tetracloreto de carbono) ou hemolisados com saponina, apesar de os valores de referência para tal determinação terem sido estabelecidos a partir de dados tendo apenas solução de hemoglobina como amostra. Assim, para verificar se há ou não coerência na utilização indiscriminada daqueles valores de referência para dosagem de HbA<sub>2</sub> em amostras de hemolisado com saponina, foi feita a dosagem desta proteína utilizando quatro tipos de hemolisados. Na 1ª etapa da avaliação foram procedidas trinta determinações para fração de Hb A<sub>2</sub> a partir de hemolisado com saponina e hemolisado clássico com tetracloreto de carbono; na 2ª etapa mais 40 determinações foram analisadas utilizando hemolisado com saponina e com clorofórmio, porém acrescidos de cianeto de potássio (KCN). A análise estatística feita através de teste t pareado na 1ª etapa, revelou uma tendência de que os resultados obtidos a partir de saponina para amostras com níveis normais de HbA<sub>2</sub> sejam maiores cerca de 0,42% que aqueles obtidos a partir da solução de hemoglobina ( $p < 0,001$ ). Porém, quando adiciona-se KCN no hemolisado não houve diferença significativa entre o hemolisado clássico (solução de hemoglobina) e o hemolisado com saponina. Deste modo, a utilização de diferentes tipos de hemolisados como amostra (saponina sem KCN ou solução de hemoglobina) podem gerar resultados distintos para a dosagem de HbA<sub>2</sub>. Determinações de Hb A<sub>2</sub> feitas especificamente com hemolisado com saponina tendem a superestimar os resultados, quando comparados a valores de referência estabelecidos a partir de hemolisado clássico. Assim, a utilização do hemolisado clássico ou de saponina com KCN são indicados para a dosagem de Hb A<sub>2</sub> pelo método de eluição eletroforética. O uso de hemolisado apenas com saponina requereria a utilização de valores de referência específicos.

**PALAVRAS CHAVE.** Hemoglobina A; hemolisado; eletroforese; hemoglobinopatias.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Maranhão

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz- São Paulo

<sup>3</sup> LIM 23 - Instituto de Psiquiatria , Hospital das Clínicas da FM-USP

\*Correspondência: e-mail: rago@usp.br



## INTRODUÇÃO

A determinação dos níveis das diferentes frações de hemoglobinas é condição básica para o diagnóstico diferencial de muitas hemoglobinopatias<sup>5</sup>. Em um indivíduo normal estão presentes as hemoglobinas A (96-98%), A<sub>2</sub> (2,5-3,7%) e traços de hemoglobina fetal (0-1%)<sup>6</sup>.

A dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) é comumente feita utilizando-se como amostra solução de hemoglobina (hemolisado clássico com clorofórmio ou tetracloreto de carbono) ou hemolisados com saponina, apesar de os valores de referência para tal determinação terem sido estabelecidos a partir de dados tendo apenas solução de hemoglobina como amostra.

Dependendo do tipo de hemoglobinopatia, os níveis de hemoglobina A e fetal podem variar de modo bem amplo, como de zero à quase 100%. Para a hemoglobina A<sub>2</sub>, entretanto, seus valores não se elevam ou decaem de modo tão grande, chegando apenas a valores de quase zero à no máximo 10%. Deste modo, sua determinação requer um bom controle de qualidade e a utilização de valores de referência apropriados<sup>5</sup>.

O diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias se faz através da caracterização laboratorial da presença de hemoglobinas anormais. Ao contrário das outras hemoglobinas, a HbA<sub>2</sub> tem de ser medida com considerável precisão e exatidão, porque o diagnóstico de algumas destas entidades clínicas, como por exemplo as  $\beta$  talassemias menores pode depender de um valor de HbA<sub>2</sub> somente 1 a 2% acima do intervalo de referência<sup>3</sup>.

Embora os protocolos técnicos particularizem o tipo de amostra a ser usado para a determinação da hemoglobina fetal (HbF), onde só deve ser feita a partir de hemolisado clássico - solução de hemoglobina - (obtido a partir de clorofórmio ou tetracloreto de carbono), esta restrição não ocorre necessariamente para dosagem de HbA<sub>2</sub>. Deste modo, nosso trabalho se propôs a estudar a possibilidade de uso do hemolisado com saponina para a dosagem da HbA<sub>2</sub>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Uma vez que não há diferenças entre os níveis de hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e fetal em amostras de indivíduos acima dos 6 meses de idade, não anêmicos e com hemoglobinas normais, todas as amostras incluídas em nossa casuística eram de indivíduos com mais de 2 anos de idade, que apresentavam níveis de hemoglobina acima de 13 g/dl, padrão eletroforético normal à eletroforese alcalina em pH 8,6, bem como valores normais para o VCM, HCM e CHCM obtidos por automação e sem alterações na morfologia eritrocitária e no teste de resistência osmótica em NaCl a 0,36%.

Em uma 1ª etapa foram analisadas 30 amostras de sangue periférico de crianças com mais de 2 anos, de Creches do município de São Luís, MA. Na 2ª etapa, 40 amostras de sangue periférico de adultos de Centros de Saúde da cidade de São Paulo, SP.

Na 1ª etapa, as amostras foram alíquotadas em duas partes onde para cada uma foi realizado o preparo dos hemolisados pelos seguintes protocolos:

**Protocolo 1:** foi utilizado como reativo hemolisante uma solução de saponina a 1% (1g saponina qsp 100 ml de água destilada). Para amostras de sangue com hematócrito acima de 40% misturou-se 1 volume de sangue em 2 volumes de reativo hemolisante. Para amostras com hematócrito entre 30 e 40% misturou-se 1 volume de sangue em 1 volume de reativo hemolisante, como descrito por Naoum<sup>7</sup>. Homogeneizou-se e aguardou-se 5 minutos para a hemólise completa da mistura.

**Protocolo 2:** obtenção do hemolisado clássico (solução de hemoglobina) com tetracloreto de carbono. Centrifugou-se 2 ml da amostra a 1500 rpm por 5 min; removeu-se o plasma sobrenadante e lavou-se os eritrócitos por duas a três vezes com solução de NaCl a 0,85%; após última lavagem e centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se um volume equivalente de água destilada, homogeneizou-se e completou-se com volume de tetracloreto de carbono equivalente ao do hemolisado formado; agitou-se vigorosamente o tubo de ensaio e centrifugou-se a 2000 rpm por 15 min. Retirou-se a camada superior correspondente à solução de hemoglobina.

Na 2ª etapa foi utilizado os protocolos **1**, porém à solução de saponina a 1% foi acrescido KCN a 0,01% e **2**, com substituição de tetracloreto de carbono por clorofórmio mais o acréscimo de KCN 0,05% ao hemolisado, na proporção de 2:1.

As dosagens de hemoglobina A<sub>2</sub> nas duas etapas foram realizadas pelo método de eluição eletroforética, descrito por Marengo- Rowe<sup>5</sup>.

## RESULTADOS

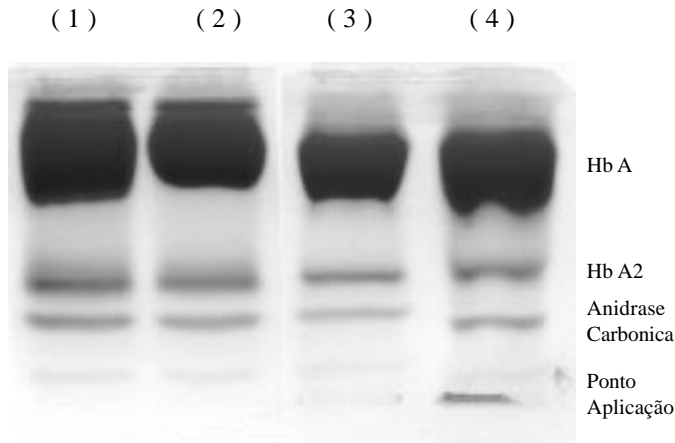
Estão dispostas às tabelas 1 e 2.

**Tabela 1-** Análise de teste t pareado entre as dosagens de HbA<sub>2</sub> tendo como amostras hemolisados com saponina versus hemolisado clássico obtido com tetracloreto de carbono.

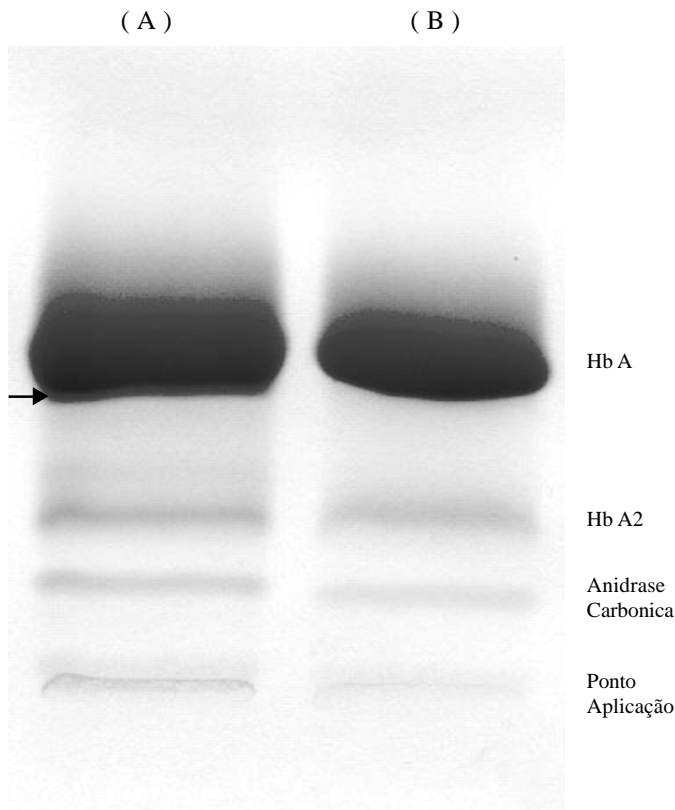
n	Saponina Média(%)	Tetracloreto Média(%)	t	p
30	2,57	2,15	9,73	< 0,001

**Tabela 2 -** Análise de teste t pareado entre as dosagens de HbA<sub>2</sub> tendo como amostras hemolisados com saponina + KCN versus hemolisado clássico obtido com clorofórmio + KCN.

n	Saponina + KCN Média %	Clorofórmio + KCN Média %	t	p
40	2,66	2,62	0,607	0,547



**Figura 1** - Eletroforese alcalina de Hb em acetato de celulose, com diferentes tipos de hemolisados. ( 1 ) Clorofórmio; ( 2 ) Clorofórmio + KCN; ( 3 ) Saponina + KCN; ( 4 ) Saponina



**Figura 2** - Eletroforese alcalina de Hb em acetato de celulose com hemolisado clássico estocado. ( A ) com KCN; ( B ) sem KCN. A seta indica a metahemoglobina.

### DISCUSSÃO

Os resultados obtidos à tabela 1, revelaram diferenças significativas (teste t,  $p < 0,001$ ) quando foi utilizado hemolisado com saponina em comparação ao hemolisado clássico. Eles sugerem

haver uma tendência de que os valores obtidos para dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> a partir de hemolisado com saponina serem, em média, 0,42% maiores que aqueles obtidos por hemolisado clássico.

Além disso, todas as determinações (100%) obtidas na 1<sup>o</sup> etapa pelo protocolo 1 (hemolisado com saponina) tiveram resultados maiores que aqueles obtidos pelo protocolo 2 (hemolisado clássico) reiterando a tendência de um grupo de resultados ser maior que o outro.

Os resultados obtidos na tabela 2, demonstram não haver diferenças nas dosagens de HbA<sub>2</sub> com hemolisado clássico, quando comparados ao hemolisado com saponina acrescido de KCN.

Essa diferença nos resultados, pode ser explicada, em parte, pela inconveniência da saponina pura em deixar no hemolisado o estroma celular, juntamente com membrana, proteínas e outras debris. Isto dificulta, tanto a entrada das hemoglobinas nos poros da fita de acetato de celulose, como também, a corrida da amostra no campo elétrico. De modo que os cortes das frações A e A2 ficam comprometidos, mesmo com uma boa aplicação da amostra por parte do operador (Fig.1, amostra 4). Além disso, a instabilidade molecular e a formação de metahemoglobina em amostras estocadas também pode causar uma separação menos definida entre as bandas, prejudicando os cortes das frações<sup>1</sup>. Porém, a presença de KCN na solução de saponina estabiliza a hemoglobina em cianometahemoglobina (HbCN)<sup>1</sup>, eliminando essas alterações moleculares, definindo com mais clareza as bandas eletroforéticas (Fig.1, amostra 3), de modo que quando comparadas com o hemolisado clássico + KCN (Fig.1, amostra 2), não houve diferença significativa entre eles na quantificação de HbA<sub>2</sub>.

O hemolisado clássico + KCN tem grande vantagem nos hemolisados clássico sem KCN quando é utilizada em amostras estocadas, pois a metahemoglobina formada durante a estocagem pode ser convertida em cianometahemoglobina pelo KCN (Fig.2). De modo que as bandas ficam bem definidas e nítidas, semelhantes às amostras não estocadas (frescas).

Assim, os nossos resultados sugerem que para a determinação de HbA<sub>2</sub> é mais prudente a utilização de hemolisado obtido através de tetracloreto de carbono ou clorofórmio (hemolisado clássico) ou saponina com KCN. Para amostras estocadas, é mais coerente a utilização do hemolisado clássico acrescido de KCN. Somente nas amostras com suspeitas ou com diagnósticos de metahemoglobinemias, hemoglobinas instáveis e Hb M o uso de KCN deve ser utilizada com cautela.

### CONCLUSÃO

A utilização de hemolisado obtido somente com a solução de saponina a 1% gera resultado distinto com o do hemolisado clássico na determinação quantitativa de Hb A<sub>2</sub>, superestimando os valores.

Os hemolisados clássicos (tetracloreto de carbono ou clorofórmio) e o hemolisado com saponina + KCN demonstraram serem adequados para esta finalidade.

O uso de hemolisado apenas com saponina requereria a utilização de valores de referência específicos.

Oliveira, R. A.G. - Could the saponin hemolysate be used for the hemoglobin A<sub>2</sub> dosage ? **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 17 - 20,2003.

**ABSTRACT.** It was made the evaluation of the hemoglobin A<sub>2</sub>(Hb A<sub>2</sub>) determination using four hemolysate types. In the 1<sup>st</sup>. stage of the evaluation thirty determinations were proceeded for fraction of Hb A<sub>2</sub> starting from hemolysate with saponine and starting from carbon tetrachloride, in the 2<sup>nd</sup> stage more 40 determinations were analyzed using hemolysate obtained through saponine and with cloroform, however added with potassium cyanide (KCN). The statistical analysis done through test t in the 1<sup>st</sup> , it revealed a tendency of the results obtained starting from saponine are larger about 0,42% that those obtained starting from carbon tetrachloride (p<0,001). However, when KCN is added in the hemolysate there is no significant difference among the classic hemolisado and with the saponine. Like this, the use of the classic hemolysate or of the saponine with KCN are indicative for Hb A<sub>2</sub> quantitative determination for the method of elution.

**KEY WORDS:** Hemoglobin A<sub>2</sub>; hemolysate; hemoglobinopatias; electrophoresis.

---

#### REFERÊNCIAS

- 1- Brozovi'c, M. ; Henthorn, J. Investigation of anormal haemoglobins and thalassaemia. In: Dacie, J.V.; Lewis, S.M. **Practical Haematology**. 8<sup>th</sup> ed. London : Churchill Livinstone, 1995, p.249-286.
- 2- Fairbanks, V.F; Lee, G.G. Aspectos bioquímicos da hematologia. In: Burtis CA, Ashwood ER, **Tietz. Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 36, p.681-706.
- 3- Lee, G.R et al. **Wintrobe: Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 36, pág. 1120.
- 4- Lukens, J.N. Talassemias e Distúrbios Afins: Distúrbios Quantitativos da Síntese da hemoglobina. In: Lee, G.R. et al. **Wintrobe: Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 39, p. 1206-1235.
- 5- Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of humam haemoglobin on celuloze acetate. **J Clin Pathol**, 18: 790-792, 1965.
- 6- Mazza, U. et al. Clinical and Haematological data in 254 cases of beta-thalassaemias trait in Italy. **Br J Haematol** 33: 91-99, 1976.
- 7- Naoum, P.C. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997, pág 171.

Recebido em 14/06/2002 ; Aprovado em 13/03/2003

# Carotenoids of tomato and tomato paste: verification of the occurrence of $\gamma$ -carotene

## Carotenóides de tomate e extrato de tomate: verificação da ocorrência de $\gamma$ -caroteno

Mieko KIMURA<sup>1</sup>  
Delia RODRIGUEZ-AMAYA<sup>1\*</sup>

RIALA6/934

Kimura, M. e Rodriguez-Amaya, D. - Carotenoids of tomato and tomato paste: verification of the occurrence of  $\gamma$ -carotene. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 21 - 26, 2003

**ABSTRACT.** Tomato and tomato paste are among the most consumed foodstuffs worldwide. Although their carotenoid compositions have been widely determined, some inconsistencies can be discerned in the literature. In Brazil,  $\gamma$ -carotene was detected in fresh tomato but not in various tomato products, using open column chromatography (OCC). On the other hand, very high amounts of this carotenoid were obtained in American tomato products, using high performance liquid chromatography (HPLC). Thus, this work was carried out to verify if the difference in data was due to natural variation or an artifact of the analysis. In fresh tomato, 11 carotenoids were identified: *trans*-lycopene, phytoene, phytofluene,  $\beta$ -carotene, lutein, 13-*cis*-lycopene, 15-*cis*-lycopene,  $\gamma$ -carotene, *trans*- $\zeta$ -carotene, *cis*- $\zeta$ -carotene, and neurosporene. In tomato paste, aside from the mentioned carotenoids, *cis*- $\beta$ -carotene and four unidentified carotenoids were also detected.  $\gamma$ -Carotene was found in comparable concentrations in Brazilian and American tomato pastes, at levels much lower than  $\beta$ -carotene, apparently below the detection limit of OCC. The removal of the peel and the maturity stage of the fresh tomatoes could not explain the loss of  $\gamma$ -carotene in Brazilian tomato pastes, indicating that degradation was involved. The results do not lend support to the high levels of  $\gamma$ -carotene in American tomato products.

**KEYWORDS.** tomato, tomato products, carotenoids,  $\gamma$ -carotene

### INTRODUCTION

In recent years, the marked improvement in the efficiency of high performance liquid chromatographic (HPLC) columns, together with the on-line acquisition of UV-visible spectra with the photodiode array detector, have greatly facilitated the analysis of complex mixtures of carotenoids in foods. With these refinements in analytical instrumentation, conditions are propitious for the clarification of some diverging data in the literature.

Tomato and tomato products are among the most consumed foodstuffs worldwide and are often the major sources of carotenoids for the population. Although widely studied in terms of its carotenoid composition, some inconsistencies in the results reported can be discerned. For example,  $\gamma$ -carotene was found in 10 sample lots of fresh Brazilian tomatoes at  $0.7 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ , but not in 39 samples of tomato products (juice, paste, puree and catchup)<sup>9</sup>. On the other hand, substantial amounts of  $\gamma$ -carotene (means of 15 to 100  $\mu\text{g/g}$ ), surpassing  $\beta$ -carotene

<sup>1</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, CP. 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP.

\* A quem a correspondência deve ser endereçada. E-mail: delia@fea.unicamp.br

(means of 2.3 to 15  $\mu\text{g/g}$ ), were found in tomato products in the U.S. (total of 52 samples of tomato soups, tomato juice, whole tomatoes, catchup, spaghetti sauce, paste, puree, and sauce), contributing significantly to the vitamin A value of this products<sup>12</sup>.

Based on the data of different laboratories, Gross<sup>4</sup> noted that the total carotenoid content of raw red tomato varied between 90 and 190  $\mu\text{g/g}$  fresh weight. Lycopene, the major pigment, made up to 90% of the total, with phytoene and phytofluene constituting 15-30%. Minor pigments identified were  $\beta$ -carotene,  $\zeta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, and neurosporene. Data obtained by HPLC methods for ripe tomatoes vary from 3.6 to 17  $\mu\text{g/g}$   $\beta$ -carotene and 7 to 116  $\mu\text{g/g}$  lycopene<sup>1-3,5-7,10-12</sup>. In tomato products the carotenoid composition will vary depending on the carotenoid composition in the raw material, and the time and severity of the processing treatment that result in varying degrees of degradation.

The importance of reliable carotenoid data cannot be overemphasized, and there is a worldwide effort to this end. Thus, this work was carried out to restudy the qualitative composition of tomato and tomato paste so as to verify if the difference in data is due to natural variation of the samples or to artifacts of the analytical process.

## MATERIAL AND METHODS

### 1. Sample collection and preparation

Fresh tomatoes were purchased from supermarkets in Campinas and analyzed on the same day. Tomato paste of the three commercial brands with the largest sale volume in Brazil were also bought in Campinas. Three national brands of tomato paste from the United States were acquired from grocery stores in Washington, DC.

The fresh tomatoes were homogenized in a Waring blender and 10 to 20 g subsamples were taken for immediate analysis. Since tomato pastes would undergo homogenization during processing, the tomato paste samples were simply mixed and 10 g samples were taken for analysis.

### 2. HPLC analysis

Carotenoids were extracted with cold acetone, transferred to petroleum ether and concentrated in a rotary evaporator as described by Rodriguez-Amaya<sup>8</sup>. The concentrated extracts were transferred to vials, brought to dryness with  $\text{N}_2$ , redissolved in 2 mL HPLC grade acetone with ultrasonic agitation, filtered through PTFE filters of 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) and injected into the HPLC instrument.

A Varian model 9010 ternary solvent system equipped with Waters model 994 photodiode array detector and a Waters model 2690 separation module equipped with Waters model 996 photodiode array detector were used. Separation of the carotenoids was carried out with a polymeric  $\text{C}_{18}$  Vydac 218 TP 54 (Separations Group) column, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 250 mm, using as

mobile phase methanol: tetrahydrofuran (with 0.01% butylated hydroxytoluene), (95:5) at a flow rate of 0.8 mL/min. A Spherisorb S5 ODS2 narrow bore column (Waters), 5  $\mu\text{m}$ , 2.0 x 250 mm, was also used with acetonitrile:methanol:ethyl acetate (73:20:7) as mobile phase at a flow rate of 0.25 mL/min. Detection of peaks was done at 450 nm and at the wavelengths of maximum absorption (max plot), and the peak purity was verified through the spectra taken at the ascending and descending slopes and at the maximum by the photodiode array detector.

### 4. Open column chromatography (OCC)

A glass column, 25 (id) x 300 mm, packed with MgO:Hyflosupercel (1:1) activated at 110°C for 4 hours<sup>8</sup> was used to separate the total extract into three bands corresponding to  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene and lycopene, which were eluted with 12% acetone in petroleum ether, 20% acetone in petroleum ether, and acetone and 10% water in acetone, respectively.

### 5. Identification of the carotenoids

The carotenes (i.e. hydrocarbon carotenoids) were identified by the combined use of the visible absorption spectra and the chromatographic behavior in TLC, using silica thin layer plates developed with 5% methanol in toluene, HPLC, and OCC. Lutein, the only xanthophyll (i.e. carotenoid containing oxygen substituents) identified, was also submitted to chemical tests to confirm the type and position of the substituents. These were acetylation with acetic anhydride of secondary hydroxyl groups and methylation with acidified methanol of hydroxyl groups in allylic position. The conclusive identification of carotenoids was discussed in detail by Rodriguez-Amaya<sup>8</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Identity of the tomato carotenoids

Of the eleven carotenoids identified in fresh tomato, 10 were carotenes. These carotenoids eluted with the solvent front on the silica TLC plates developed with 5% methanol in toluene, before lutein in the MgO:Hyflosupercel column, and after lutein in the HPLC reverse phase column, indicating the absence of oxygen functions. Lycopene, neurosporene,  $\zeta$ -carotene, and phytofluene exhibited visible absorption spectra with three well defined peaks, reflecting their acyclic structures, at wavelengths commensurate with chromophores of 11, 9, 7 and 5 conjugated double bonds, respectively (Table 1). Phytoene absorbed maximally at 286 nm with shoulders at 276 and 297 nm, consistent with a conjugated double bond system of only three double bonds. Although also having 11 conjugated double bonds,  $\gamma$ -carotene and  $\beta$ -carotene absorbed maximally at wavelengths lower than lycopene and displayed less spectral fine structure because of their monocyclic and dicyclic structures, which put one and two conjugated double bonds, respectively, in  $\beta$ -rings.

**Table 1.** Wavelengths of maximum absorption ( $\lambda_{\max}$ ) of the carotenoids of tomato

Carotenoid	$\lambda_{\max}$ nm (petroleum ether)	$\lambda_{\max}$ nm (mobile phase)*
1 - lutein	421, 442, 470	425, 446, 475
2 - trans-lycopene	442, 468, 500	446, 473, 504
3 -13-cis-ycopene	-	361, 446, 473, 504
4 -15-cis-lycopene	437, 463, 495	360, 444, 468, 498
5 - neurosporene	416, 438, 467	418, 440, 469
6 - $\gamma$ -carotene	435, 458, 488	438, 463, 494
7 - cis- $\zeta$ -carotene	-	297, 379, 400, 425
8 - $\zeta$ -carotene	376, 400, 424	380, 402, 426
9 - $\beta$ -carotene	(424), 448, 476	(428), 454, 480
10 - phytofluene	-	330, 349, 366
11 - phytoene	-	(276), 286, (297)

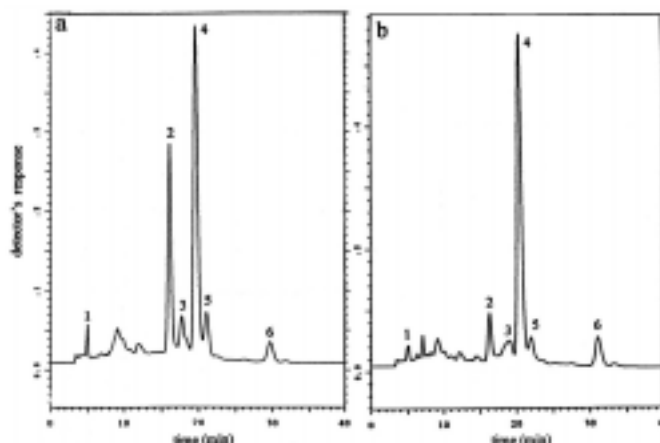
\*Acetonitrile:methanol:ethyl acetate (73:20:7). 13-Cis- lycopene, cis- $\zeta$ -carotene, phytofluene and phytoene were detected only in HPLC.

The presence of two *cis*-isomers of lycopene and a *cis*-isomer of  $\zeta$ -carotene was observed only in HPLC, the *cis*-configuration being shown by the wavelengths of maximum absorption lower than those of the respective *trans*-carotenoids and the *cis*-peaks at 361, 360, and 297 nm, respectively. The designation of the 13-*cis*- and 15-*cis*-lycopene was based on the height of the *cis*-peak, which would be higher as the location of the *cis*-double bond approached the center of the molecule.

Compared to  $\beta$ -carotene, lutein absorbed maximally at slightly lower wavelengths, reflecting its chromophore of 10 conjugated double bonds, and had slightly more defined peaks because only one conjugated double bond was in a ring. The presence of two secondary hydroxyl groups was demonstrated by the positive response to acetylation with acetic anhydride, and the allylic position of one of these groups by the positive reaction to methylation with acidified methanol.

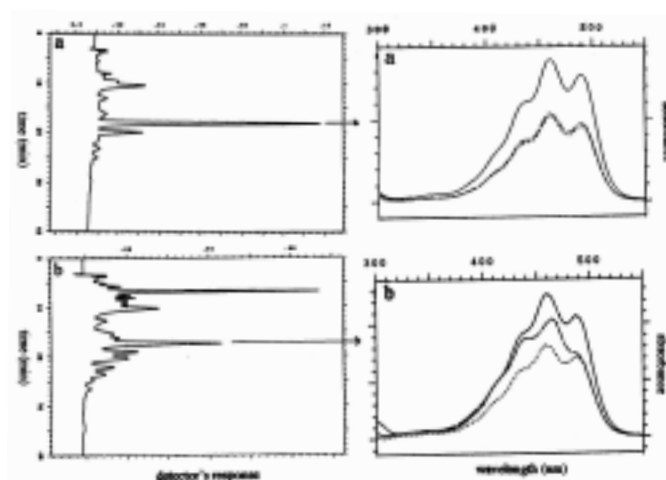
## 2. Occurrence of $\gamma$ -carotene in Brazilian tomato paste

Typical chromatograms obtained with the Vydac column of Brazilian fresh tomatoes and tomato paste are shown in Figure 1, the carotenoid patterns being similar for the three brands of pastes. The Vydac column had been widely used in carotenoid analysis because of its efficiency. Chromatograms of the carotenoids of fresh tomato, taken at 450 nm, had six defined peaks, which were identified as lutein,  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, *trans*-lycopene, 13-*cis*-lycopene and 15-*cis*-lycopene. More peaks appeared in the chromatograms of the tomato paste carotenoids and the peak corresponding to  $\gamma$ -carotene appeared distorted. The visible spectra taken at different points of the peak revealed that it was a mixture.



**Figure 1.** HPLC chromatograms of Brazilian fresh tomato (a) and tomato paste (b) extracts obtained with the Vydac column. Chromatographic conditions are described in text. Detection was set at 450 nm. Peak identification: 1. lutein, 2.  $\beta$ -carotene, 3.  $\gamma$ -carotene in fresh tomato and mixture in paste, 4. *trans*-lycopene, 5. 13-*cis*-lycopene and 6. 15-*cis*-lycopene.

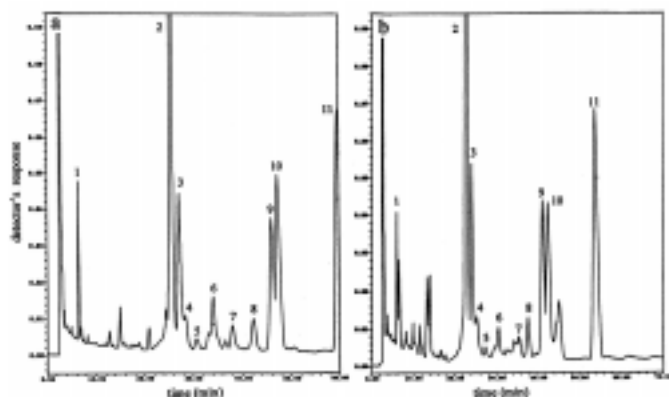
Because of the predominance of lycopene, the  $\gamma$ -carotene peak appeared very small. To verify better the occurrence of  $\gamma$ -carotene in tomato paste, preliminary separation on a MgO:Hyflosupercel column was undertaken to separate the  $\beta$ -carotene fraction, the  $\gamma$ -carotene fraction, and the lycopene fraction before HPLC. The chromatograms of the  $\gamma$ -carotene fractions of fresh tomato and tomato paste and the spectra taken at different points of the peak corresponding to  $\gamma$ -carotene are presented in Figure 2. While the purity of the  $\gamma$ -carotene peak of fresh tomato was confirmed, the three spectra resembling each other, that of the tomato paste proved to be  $\gamma$ -carotene mixed with other compounds, probably carotenoid degradation products. If not separated, these compounds would be quantified with  $\gamma$ -carotene, raising its concentration.



**Figure 2.** HPLC chromatograms of the  $\gamma$ -carotene fraction obtained with Vydac column and absorption spectra of peak corresponding to  $\gamma$ -carotene of Brazilian fresh tomato (a) and tomato paste (b). Chromatographic conditions are described in text.

The chromatograms obtained with the Vydac column demonstrated that many minor compounds could elute in the region between  $\beta$ -carotene and lycopene. To separate these minor peaks better, other chromatographic conditions were tested.

Better separation was achieved with a monomeric Spherisorb S5 ODS2 narrow bore column, using acetonitrile:methanol:ethyl acetate (73:20:7) as mobile phase (Figure 3). Setting detection at the wavelengths of maximum absorption, 11 carotenoids were identified in fresh tomatoes: lutein, *trans*-lycopene, 13-*cis*-lycopene, 15-*cis*-lycopene, neurosporene,  $\gamma$ -carotene, *cis*- $\zeta$ -carotene, *trans*- $\zeta$ -carotene,  $\beta$ -carotene, phytofluene, and phytoene. In the tomato paste, *cis*- $\beta$ -carotene and four other unidentified carotenoids were also detected.

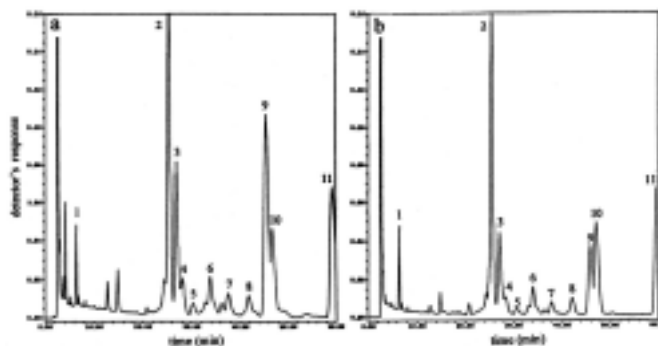


**Figure 3.** HPLC chromatograms of Brazilian fresh tomato (a) and tomato paste (b) extracts obtained with Spherisorb S5 ODS2 narrow bore column. Chromatographic conditions are described in the text. Detection was set at the wavelength of maximum absorption. Peak identification: 1. lutein, 2. *trans*-lycopene, 3. 13-*cis*-lycopene, 4. 15-*cis*-lycopene, 5. neurosporene, 6.  $\gamma$ -carotene, 7. *cis*- $\zeta$ -carotene, 8. *trans*- $\zeta$ -carotene, 9.  $\beta$ -carotene, 10. phytofluene, 11. phytoene.

The purity of the  $\gamma$ -carotene peak was confirmed in both the fresh tomato and tomato paste.  $\gamma$ -Carotene was apparently lower in the tomato paste, however. This level was probably below the detection limit of the open column chromatographic method used by Tavares and Rodriguez-Amaya<sup>9</sup>, explaining why  $\gamma$ -carotene was not detected in tomato products in this work.

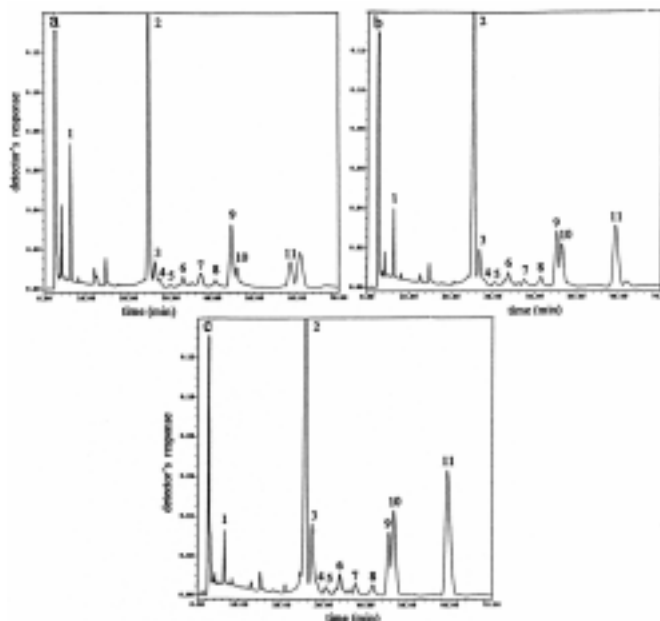
An attempt was also made to explain the unexpected lowering of the  $\gamma$ -carotene content in Brazilian tomato paste. Considering the °Brix reported by Tavares and Rodriguez-Amaya<sup>9</sup>, the tomato paste samples analyzed would be about five times more concentrated than the fresh tomato. Thus, significant loss of  $\gamma$ -carotene occurred during the processing of Brazilian tomato paste. This loss could be due to any one or a combination of the following factors: (a) removal of the peel, (b) stage of maturity of the tomatoes used as raw materials, and (c) degradation of the carotenoid during processing.

Comparison of the chromatograms of the pulp and the peel of the same lot of tomatoes (Figure 4) showed that, although  $\beta$ -carotene (peak 9) was much higher in the peel,  $\gamma$ -carotene (peak 6) appeared practically the same in the pulp and the peel.



**Figure 4.** HPLC chromatograms of peel (a) and pulp (b) of fresh tomato extracts. Chromatographic conditions and peak identification are same the figure 3.

Verification of the effect of the stage of maturity showed that with the exception of  $\beta$ -carotene, which was practically the same at the three stages of maturity, all other carotenoids, including  $\gamma$ -carotene, increased from the almost ripe to the overripe stage (Figure 5). The maturity effect, therefore, could not account for the disappearance of  $\gamma$ -carotene in the processed Brazilian tomatoes.



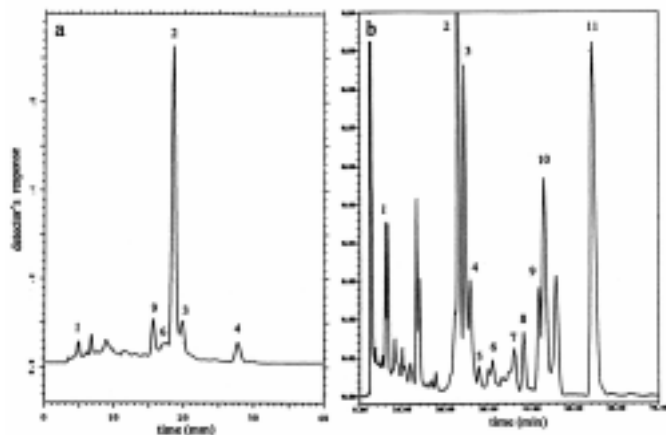
**Figure 5.** HPLC chromatograms of fresh tomato at three different stages of maturity: almost ripe (a), ripe (b) and overripe (c). Chromatographic conditions and peak identification are same the figure 3.

The major reason for loss of  $\gamma$ -carotene therefore appeared to be degradation during processing. The *trans*-lycopene content of the tomato paste products (means of 158 to 183  $\mu\text{g/g}$ ) analyzed by Tavares and Rodriguez-Amaya<sup>9</sup> were in the expected range (about 155  $\mu\text{g/g}$ ), calculated from the soluble solids. The  $\beta$ -carotene levels of the pastes (means of 4.3 to 8.7  $\mu\text{g/g}$ ) were in the same range as the fresh tomato ( $5.1 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ ), falling short of the expected values (about 25  $\mu\text{g/g}$ ). This could be partly explained by the removal of the peel, which appeared to have much higher levels of  $\beta$ -carotene as mentioned earlier.  $\gamma$ -Carotene content in the paste should be about 3.5  $\mu\text{g/g}$ , this small amount being practically lost during processing.

## 2. Occurrence of $\gamma$ -carotene in American tomato paste

An attempt was made to find an explanation for the discrepancy in the data obtained by Tonucci et al.<sup>12</sup> and Tavares e Rodriguez-Amaya<sup>9</sup>. The difference in the  $\gamma$ -carotene contents of American and Brazilian tomato pastes, could be due to any one or a combination of the following factors: (a) difference in tomato cultivars used as raw materials, (b) difference in the processing condition, and (c) analytical variation.

Typical chromatograms of the carotenoids of tomato pastes produced in the United States, obtained with the Vydac and Spherisorb column are shown in Figure 6, the three brands showing similar patterns.



**Figure 6.** Typical HPLC chromatograms of the carotenoids of American tomato pastes obtained with Vydac 218 TP 54 (a) and Spherisorb S5 ODS2 (narrow bore) columns. Chromatographic conditions are described in the text. Peaks identification are the same as Figure 3.

The major differences in the carotenoids patterns of the tomato paste were: (a) phytoene, *cis*-lycopene, and *cis*- $\beta$ -carotene were markedly higher in the American tomato paste, and (b) two unidentified peaks, one very close to lutein and the other to  $\gamma$ -carotene were also greater in the American tomato pastes. The  $\gamma$ -carotene peak, however, appeared essentially of same magnitude and evidently smaller than the  $\beta$ -carotene peak in both pastes. Thus, this comparison did not shed any light on the huge difference in the  $\gamma$ -carotene content ( $99.8 \pm 11.5 \mu\text{g/g}$  vs. not detected) of the American and Brazilian tomato pastes analyzed by Tonucci et al.<sup>12</sup> and Tavares and Rodriguez-Amaya<sup>9</sup>. According to the chromatograms obtained in Figures 1 and 5, the American and Brazilian tomato pastes should have practically the same amounts of  $\gamma$ -carotene. The lycopene level ( $554.5 \pm 4.33$  vs. means of 158 to 183  $\mu\text{g/g}$ ) was about three times in the American tomato paste while the  $\beta$ -carotene content ( $12.7 \pm 2.4$  vs. means of 4.3 to 8.7  $\mu\text{g/g}$ ) was slightly higher<sup>9,12</sup>.

A closer look at the chromatogram presented by Tonucci et al.<sup>12</sup> revealed that the  $\beta$ -carotene peak was substantially greater than the  $\gamma$ -carotene peak. Even considering that the  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  of  $\gamma$ -carotene (3100 in petroleum ether) is higher than the of  $\beta$ -carotene (2592 in petroleum ether), and the change in the mobile phase (a gradient was used), the  $\gamma$ -carotene concentration could not be much higher (almost 8 times) than that of  $\beta$ -carotene.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge with gratitude the financial support given by MCT-FINEP-CNPq through the project PRONEX n<sup>o</sup> 4196091500.



Kimura, M. e Rodriguez-Amaya, D. - Carotenóides de tomate e extrato de tomate: verificação da ocorrência de  $\gamma$ -caroteno. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 21 - 26 ,2003

**RESUMO.** Tomate e extrato de tomate estão entre os alimentos mais consumidos no mundo. Embora as suas composições de carotenóides tenham sido amplamente determinadas, algumas inconsistências podem ser verificadas na literatura. No Brasil, usando cromatografia em coluna aberta (CCA), o  $\gamma$ -caroteno foi detectado em tomate fresco, mas não em vários produtos de tomate. Por outro lado, altas quantidades deste carotenóide foram relatados em produtos de tomate americanos, usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Assim, este trabalho foi realizado para verificar se a diferença nos dados é devido à variação natural ou um artefato da análise. Em tomate fresco foram identificados *trans*-licopeno, fitoeno, fitoflueno,  $\beta$ -caroteno, luteína, 13-*cis*-licopeno, 15-*cis*-licopeno,  $\gamma$ -caroteno, *trans*- $\zeta$ -caroteno, *cis*- $\zeta$ -caroteno, e neurosporeno. Em extrato de tomate, além destes carotenóides, foram detectados o *cis*- $\beta$ -caroteno e quatro carotenóides não identificados.  $\gamma$ -Caroteno foi encontrado em concentrações comparáveis nos extratos de tomate brasileiros e americanos, a níveis muito menores que do  $\beta$ -caroteno, aparentemente abaixo do limite de detecção do CCA. A remoção da pele e o estado de maturação do tomate fresco não justificariam a perda de  $\gamma$ -caroteno nos extratos de tomate brasileiros, indicando o envolvimento da degradação. Os resultados não corroboraram com os altos níveis de  $\gamma$ -caroteno reportados nos produtos de tomate americanos.

**Palavras-chave:** tomate, produtos de tomate, carotenóides,  $\gamma$ -caroteno.

#### REFERENCES

1. Abushita, A.A.; Daood, H.G.; Biacs, P.A. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. **J. Agric. Food Chem.**, 48: 2075-81, 2000.
2. Hart, D.J.; Scott, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chem.**, 54: 101-11, 1995.
3. Heinonen, M.I.; Ollilainen, V.; Linkola, E.K.; Varo, P.T.; Koivistoinen, P.E. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. **J. Agric. Food Chem.**, 37: 655-9, 1989.
4. Gross, J. **Pigments in fruits**. London: Academic Press; 1987. p. 160.
5. Khachik, F.; Goli, M.B.; Beecher, G.R.; Holden, J.; Lusby, W.R.; Tenorio, M.D.; Barrera, M.R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, 40: 390-8, 1992.
6. Micozzi, M.S.; Beecher, G.R.; Taylor, P.R.; Khachik, F. Carotenoid analysis of selected raw and cooked foods associated with a lower risk for cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82: 282-5, 1990.
7. Müller, H. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A**, 204: 88-94, 1997.
8. Rodriguez-Amaya, D.B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington, D.C.: International Life Sciences Institute Press, 1999, 64 p.
9. Tavares, C.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of Brazilian tomatoes and tomato products. **Lebens. Wiss. Technol.**, 27: 219-24, 1994.
10. Tee, E.S.; Lim, C.L. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. **Food Chem.**, 41: 309-39, 1991.
11. Thompson, K.A.; Marshall, M.R.; Sims, C.A.; Wei, C.I.; Sargent, S.A.; Scott, J.W. Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. **J. Food Sci.**, 65: 791-5, 2000.
12. Tonucci, L.H.; Holden, J.M.; Beecher, G.R.; Khachik, F.; Davis, C.S.; Mulhozi, G. Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. **J. Agric. Food Chem.**, 43: 579-86, 1995.

Recebido em 25/07/2002 ; Aprovado em 06/02/2003

# Contaminantes microbiológicos em detergentes e seus congêneres

## Microbiological contaminants in detergents and similars

Adriana BUGNO <sup>1\*</sup>  
Adriana A. BUZZO <sup>1</sup>  
Tatiana C. PEREIRA <sup>1</sup>  
Maria Cristina SANTA BÁRBARA <sup>2</sup>

RIALA6/935

Bugno, A. et al - Contaminantes microbiológicos em detergentes e seus congêneres **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 27 - 30 ,2003

**RESUMO.** A finalidade do presente trabalho foi verificar a qualidade microbiológica de detergentes e seus congêneres destinados à limpeza, higienização ou alvejamento de objetos inanimados e/ou ambientes de uso comum ou coletivo, fornecendo subsídios para ações de Vigilância Sanitária. Foram analisadas 57 amostras, no período de dezembro de 2001 a abril de 2002, tendo sido observadas evidências de contaminação microbiológica em 42% dos produtos analisados, sendo que entre estes 38% corresponderam a detergentes para lavar louças, 29% a amaciantes de roupas e 25% a detergentes para limpeza geral. Os dados obtidos indicam a necessidade de um controle mais rígido quanto às BPF e C, para garantir a segurança de uso destes produtos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Microrganismos, detergentes

### INTRODUÇÃO

De acordo com a Resolução Normativa nº 1/78<sup>1</sup>, detergentes e seus congêneres são produtos destinados à limpeza, higienização ou alvejamento de objetos inanimados e/ou ambientes de uso comum ou coletivo.

A Resolução RDC nº 184, de 22/10/01<sup>2</sup>, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece normas e procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários. No parágrafo 2º do artigo 1º, esta Resolução estabelece que “as empresas legalmente autorizadas a produzir ou importar estão sujeitas à verificação do cumprimento das

Boas Práticas de Fabricação e Controle...”, sendo que no caso das Indústrias de Saneantes Domissanitários, as diretrizes para sua implantação estão estabelecidas pela Portaria nº 327, de 30 de julho de 1997, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde<sup>3</sup>, a qual padroniza e define procedimentos, métodos de fabricação, condições das instalações, equipamentos e respectivas manutenções, critérios de segurança, bem como matérias primas, embalagens, condições de estocagem e aspectos relativos ao meio ambiente, como forma de garantir a qualidade e a segurança no uso destes produtos.

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz - Seção de Controle de Esterilidade e Pirogênio

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz – Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene

\* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902 – São Paulo / SP  
e-mail: [adrbugno@ial.sp.gov.br](mailto:adrbugno@ial.sp.gov.br)

Embora não se verifiquem parâmetros de qualidade microbiológica, estabelecidos em legislação, para produtos saneantes domissanitários, esta avaliação permite verificar o atendimento às Boas Práticas de Fabricação e Controle.

A finalidade do presente trabalho foi verificar a qualidade microbiológica de detergentes e seus congêneres, fornecendo subsídios para ações de Vigilância Sanitária.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisadas 57 amostras de procedência nacional, referentes a análises fiscais efetuadas no período de dezembro de 2001 a abril de 2002, sendo:

35 detergentes – 15 destinados à limpeza geral, 14 lava-louças e 06 correspondentes à outras categorias – 12 amaciantes de roupas, 04 limpadores multi-uso, 03 desengraxantes, 02 limpa-alumínio e 01 sabão em pó.

### Métodos

#### Preparação da amostra

Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas alíquotas de 10 g, para os produtos sólidos (detergente e sabão em pó) ou semi-sólidos (limpa-alumínio), ou de 10 mL, para os produtos líquidos, adicionadas a 90 mL de Caldo Lethen (DIFCO), utilizado por apresentar em sua composição polissorbato 80 e lecitina de soja. A partir da diluição inicial, correspondente à diluição  $10^{-1}$ , foram executadas diluições decimais seriadas até a diluição  $10^{-4}$ , utilizando Caldo Lethen como diluente.

#### Contagem de Bactérias Heterotróficas e de Fungos - Técnica de plaqueamento em profundidade<sup>(6,7)</sup>

A técnica de plaqueamento em profundidade foi utilizada para a contagem de bactérias heterotróficas e para a contagem de fungos, tendo sido executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira<sup>7</sup> e na Farmacopéia Britânica<sup>6</sup>, utilizando Ágar Caseína de soja (DIFCO) e incubação a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , por 24 a 48 horas, na contagem de bactérias e Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (ACUMEDIA) e incubação a  $(26 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ , por 5 dias, na contagem de fungos.

#### Contagem de coliformes totais e coliformes fecais - Técnica do Número Mais Provável<sup>(6,7)</sup>

A técnica do Número Mais Provável (NMP) foi utilizada para a contagem de coliformes totais e fecais, tendo sido executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira<sup>7</sup> e na Farmacopéia Britânica<sup>6</sup>, utilizando Caldo Lauril sulfato de sódio (ACUMEDIA) com incubação a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , por 24 a 48 horas, para a contagem de coliformes totais (teste presuntivo). Para o teste confirmatório de coliformes totais, foi utilizado Caldo Lactose Bile-Verde Brilhante (DIFCO) com incubação a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , por 24 a 48 horas.

Na contagem de coliformes fecais, utilizou-se Caldo EC (OXOID) com incubação a  $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas.

#### Identificação de microrganismos contaminantes

A identificação dos microrganismos contaminantes foi executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira<sup>7</sup> e na Farmacopéia Britânica<sup>6</sup>, abrangendo a pesquisa para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e outros microrganismos do grupo dos coliformes, como *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp. Os meios de culturas utilizados no isolamento de *Staphylococcus* spp foram Agar Baird Parker (DIFCO) e Agar Manitol Salgado (DIFCO), com incubação a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, sendo que as colônias suspeitas foram submetidas a avaliação micromorfológica após coloração de Gram e os cocos gram positivos, testados quanto a presença de coagulase. Para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, foi utilizado o Agar Cetrimida (OXOID) com incubação a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 48 horas sendo que colônias esverdeadas e fluorescentes sob luz ultravioleta foram repicadas para placas contendo Agar para detecção de Piocianina (OXOID) e para placas contendo Agar para detecção de Fluoresceína (OXOID), incubadas a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Colônias suspeitas foram submetidas à avaliação micromorfológica após coloração de Gram e no caso de constatação da presença de bastonetes gram-negativos foi executado teste de oxidase. Para os microrganismos oxidase positiva, foi realizada a prova de crescimento a  $41^{\circ}\text{C}$  em Caldo BHI (MERCK). Para pesquisa de *Salmonella* spp foram utilizados para enriquecimento seletivo os meios Selenito cistina (OXOID) e Rappaport-Vassiliadis (OXOID), com incubação a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, sendo o crescimento obtido transferido para placas contendo Agar Verde Brilhante (DIFCO) e Agar Bismuto Sulfito (DIFCO), incubadas a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As colônias suspeitas foram repicadas em meio RUGAI modificado, incubado a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas, então, a testes sorológicos específicos. Para a pesquisa de *Escherichia coli* e outros microrganismos do grupo dos coliformes, utilizou-se o Agar Eosina Azul de Metileno (segundo Levine) (BIOBRÁS) incubado a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As colônias observadas foram repicadas em meio RUGAI modificado e incubadas a  $(34 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quarenta e dois por cento das amostras analisadas apresentaram evidências de contaminação microbiológica, sendo que entre estas, 38% corresponderam aos detergentes lava-louças, 29% aos amaciantes de roupas, 25% aos detergentes para limpeza geral, 4% ao detergente em pó e outros 4% ao produto desengraxante. Considerando cada categoria, 64% das amostras de detergentes lava-louças analisadas, 58% das amostras de amaciantes de roupas e 40% das amostras de detergentes para limpeza geral apresentaram contaminantes microbiológicos detectáveis.

De modo geral, os produtos que evidenciaram crescimento microbiano apresentaram valores de pH entre 5,0 e 9,0. Produtos como limpador multi-uso, limpa-alumínio,

**TABELA 1** – Média das contagens obtidas para os grupos de microrganismos pesquisados de acordo com o tipo de produto avaliado

PRODUTO	Bactérias heterotróficas (UFC/g ou mL)	Bolores e leveduras (UFC/g ou mL)	Coliformes totais (NMP/g ou mL)	Coliformes fecais (NMP/g ou mL)
Amaciante de roupas	$(9,4 \pm 12,3) \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Desengraxante	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Detergente em pó	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Detergente lava louças	$(1,7 \pm 2,7) \times 10^5$	$(2,0 \pm 1,4) \times 10^3$	$(9,9 \pm 1,2) \times 10^4$	$(2,3 \pm 3,2) \times 10^3$
Detergente para limpeza geral	$(1,4 \pm 2,5) \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$	$(2,2 \pm 1,2) \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$
MÉDIA	$(8,1 \pm 7,9) \times 10^4$	$(7,0 \pm 11,0) \times 10^2$	$(5,1 \pm 6,8) \times 10^4$	$(2,3 \pm 3,2) \times 10^3$

detergente cáustico e desengraxantes, que não evidenciaram crescimento microbiano, apresentaram valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 9,0. No caso de produtos em pó, a baixa atividade de água destes produtos seria um fator que impediria eventuais contaminantes microbianos, embora em um destes produtos foi possível a detecção de contaminantes.

Considerando apenas as amostras que evidenciaram contaminação, a presença de bactérias heterotróficas foi detectada em 100% destas amostras, enquanto que a presença de coliformes totais e fecais foi detectada em 29% e 8% destas amostras, respectivamente. Com relação à presença de fungos, 17% das amostras contaminadas evidenciaram presença de bolores e leveduras.

mL ou g de aeróbios e ausência de coliformes totais e fecais) e se forem considerados o risco potencial à saúde dos consumidores, bem como a necessidade de implantação dos procedimentos de Boas Práticas de Fabricação e Controle.

As principais fontes de contaminação microbiológica durante processos produtivos são ambiente produtivo, equipamentos envolvidos no processo, pessoal, matérias primas e produtos intermediários utilizados<sup>8,9</sup>. Entre as fontes de contaminação, a água apresenta-se como uma das principais preocupações no controle de contaminação microbiológica, por apresentar ampla utilização tanto na limpeza e sanitização de equipamentos, na limpeza de áreas produtivas, de produtos e matérias primas, como no preparo dos

A Tabela 2 mostra os tipos de microrganismos detectados de acordo com a categoria de produto analisado.

**TABELA 2** – Tipos de contaminantes microbiológicos observados de acordo com o tipo de produto avaliado

PRODUTO	MICROORGANISMO OBSERVADO
Amaciante de roupas	Enterobacter spp e Bactérias Gram (-) não fermentadoras
Detergente em pó	Staphylococcus spp
Detergente lava louças	Enterobacter spp, Klebsiella spp, Pseudomonas spp e outras bactérias Gram (-) não fermentadoras
Detergente para limpeza geral	Staphylococcus spp, Klebsiella spp, Escherichia coli, Pseudomonas spp e outras bactérias Gram (-) não fermentadoras

A Tabela 1 mostra a contagem média de contaminação observada em cada categoria de produto analisado. No geral, a contagem média obtida para bactérias heterotróficas foi de  $8,1 \times 10^4$  UFC/g ou mL, para fungos foi de  $7,0 \times 10^2$  UFC/g ou mL, para coliformes totais foi de  $5,1 \times 10^4$  NMP/g ou mL e para coliformes fecais foi de  $2,3 \times 10^3$  NMP/g ou mL. Estas contagens apresentaram-se altas se comparadas às contagens permitidas para produtos que apresentam parâmetros microbiológicos estabelecidos, como os produtos cosméticos<sup>5</sup> ( $5,0 \times 10^2$  UFC/

produtos. A utilização de água de baixa qualidade microbiológica pode acarretar alterações microbianas nos produtos elaborados, inviabilizar a obtenção de produtos que atendam aos padrões microbiológicos exigidos, além de possibilitar a presença de microrganismos patogênicos, que colocam em risco a saúde do consumidor<sup>8,9</sup>.

De modo geral, os contaminantes da água são decorrentes da sua fonte e da exposição ao ambiente até chegar ao local de consumo. De acordo com as diretrizes para as Boas

Práticas de Fabricação e Controle (BPF e C) para a Indústria de Saneantes e Domissanitários<sup>3</sup>, a água de alimentação deve inicialmente atender aos critérios para água potável, ou seja, que respeite a Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990, do Ministério da Saúde<sup>4</sup>. No caso das indústrias farmacêuticas, evidências mostram que algumas contaminações microbiológicas da água utilizada estão vinculadas ao sistema de distribuição e a tanques de armazenagem, tanto da água de alimentação como da água tratada<sup>9</sup>. Para a utilização de água com qualidade microbiológica satisfatória é necessário, além do monitoramento da qualidade da água de alimentação, o estabelecimento de sistemas de purificação de água adequados

à finalidade e de procedimentos para o controle da água utilizada no processo produtivo, que devem envolver também os procedimentos de higienização dos sistemas de tratamento, dos tanques de armazenamento de água e do sistema de distribuição<sup>8,9</sup>.

### CONCLUSÃO

Dos produtos analisados, 42% apresentaram evidências de contaminação microbiana, cuja natureza, quantitativa e qualitativa, indica a necessidade de um controle mais rígido no que se refere à implantação de BPF e C como forma de garantir a segurança de uso destes produtos.

RIALA6/935

Bugno, A. et al - Microbiological contaminants in detergents and similars **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 27 - 30 ,2003.

**ABSTRACT.** The scope of this work was to verify the microbiological quality of detergents and similars used to cleanness, hygienical purposes or to whitish objects or rooms to subsidize actions by the Sanitary Vigilance. Fifty seven samples were analyzed in the period from December, 2001 to April, 2002 and it was observed microbiological contamination in 42% of the products analyzed; from these, 38% were detergents destined to washing dishes, 29% of clothes softening and 25% of detergents for general purposes. The conclusion was that there is the necessity of more rigid control of these commercial products in order to guarantee the quality and be sure about the safety of them.

**KEY WORDS.** Microorganisms, detergents

### REFERÊNCIAS

1. Brasil, Leis, decretos, etc.... Resolução Normativa nº 1, de 27 de novembro de 1978. Normas a serem obedecidas pelos detergentes e seus congêneres. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/01\\_78.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/01_78.htm)
2. Brasil, Leis, decretos, etc.... Resolução RDC nº 184, de 22 de outubro de 2001. Procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários e outros de natureza e finalidade idênticas. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2001/184\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2001/184_01rdc.htm)
3. Brasil, Leis, decretos, etc.... Portaria nº 327, de 30 de julho de 1997. Diretrizes estabelecidas pelos Regulamentos Técnicos – Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF e C). Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/327\\_97.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/327_97.htm)
4. Brasil, Leis, decretos, etc.... Portaria Federal nº 36/MS/GM, de 19 de janeiro de 1990. Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/36\\_90.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/36_90.pdf)
5. Brasil, Leis, decretos, etc.... Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Padrões de controle microbiológico para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/481\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/481_99.htm)
6. British Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 1993.
7. Farmacopéia Brasileira, 4ª ed, Parte II, 1988.
8. Macedo, J.A.B. **Águas & Águas**. Juiz de Fora: Ortofarma, 2000, 505 p.
9. Pinto, T.j.a., Kaneko, T.m., Ohara, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu Editora, 2000, 309 p.

Recebido em 27/08/2002; Aprovado em 29/04/2003

## Frequência de esfregaços cérvico-vaginais anormais em adolescentes e adultas: revisão de 308.630 casos

Frequency of abnormal uterine cervix smears from adolescents and adult women: review of 308,630 cases

Adhemar LONGATTO FILHO<sup>1</sup>

Daniela ETLINGER<sup>2</sup>

Natália S. GOMES<sup>2</sup>

Sheila V. da CRUZ<sup>2</sup>

Maria José CAVALIERI<sup>1</sup>

RIALA6/936

Longatto Filho, A. et al - Frequência de esfregaços cérvico-vaginais anormais em adolescentes e adultas: revisão de 308.630 casos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 31 - 34 ,2003

**RESUMO.** No presente trabalho, estudamos a frequência de achados de esfregaços anormais pelo exame de Papanicolaou nas populações de adolescentes (idade  $\leq 21$  anos) e adulta ( $> 21$  anos) atendidas pelo Setor de Citologia do Instituto Adolfo Lutz – Programa de Prevenção do Câncer de Colo Uterino nos últimos seis anos (1996 a 2001). Verificamos que a frequência destes achados vem aumentando gradativamente em ambas as populações, sendo sempre mais alta nas adolescentes (1,7%, 2,3%, 1,8%, 1,3%, 2,6% e 4,2%, respectivamente). Nas mulheres adultas, as lesões também sofreram progressivo aumento com o passar dos anos, com ocorrência de 1,2%, 1,3%, 1,0%, 0,9%, 1,6% e 2,5%, respectivamente. A análise estatística mostrou uma tendência linear de aumento de frequência de exames anormais em ambos os grupos sendo maior nas adolescentes. Acrescentando os dados dos quatro anos precedentes (1992 a 1995) de estudo similar, publicado anteriormente, envolvendo o mesmo tipo de populações, as diferenças foram ainda mais notáveis com relação aos anos posteriores: de 1992 a 1995, a frequência de lesões na população de adolescentes foi de 0,45%, 0,95%, 1,12% e 2,10%, e na população de adultas, 0,44%, 0,72%, 0,87% e 1,18%, respectivamente.

Uma vez que a progressão das lesões para câncer cervical se dá em um período médio de dez anos, é de grande importância que a população mais jovem, sexualmente ativa, também seja monitorada pelos Programas de Prevenção de Câncer do Colo Uterino.

**PALAVRAS-CHAVE.** Teste de Papanicolaou, câncer de colo uterino, adolescentes.

<sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Patologia – Seção de Citologia Oncótica

<sup>2</sup>Bolsista da FUNDAP

<sup>\*</sup>Endereço para correspondência: – Av Dr. Arnaldo, 351 – 7º andar Cep 01246-902 – São Paulo – SP – Brasil – Telefone 55-11 30682875

e-mail: longatto16@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

Infecções cervicais pelo Papilomavírus Humano (HPV) associadas a anormalidades citológicas em esfregaços cérvico-vaginais, vêm suscitando especial interesse em Saúde Pública, uma vez que tais infecções estão relacionadas ao câncer do colo uterino (CA) e lesões precursoras: neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) graus 1 a 3, bem como atipias de significado indeterminado em células escamosas (ASCUS) ou em células glandulares (AGUS).

Adolescentes são mais suscetíveis a estas infecções, devido à imaturidade do colo uterino e maior exposição da zona da junção escamo-colunar (JEC). Paralelamente, estas lesões parecem progredir mais rapidamente em mulheres muito jovens<sup>2</sup>. Desta forma, atividade sexual precoce e promíscua representa um fator de risco para o desenvolvimento de câncer do colo uterino.

Recentes estudos têm demonstrado uma maior prevalência de infecção pelo HPV associada a anormalidades citológicas pelo exame de Papanicolaou, em populações de adolescentes, comparadas às de mulheres adultas<sup>1,4</sup>. Embora as atipias citológicas sejam mais freqüentemente de baixo grau em adolescentes, existe o risco de progressão das mesmas para lesão de alto grau e carcinoma se não tratadas, especialmente se envolvem infecção por sub-tipos de HPV de alto risco [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58]<sup>8</sup>.

O presente estudo teve o objetivo de verificar a freqüência de achados de atipias citológicas em esfregaços cérvico-vaginais entre pacientes do sexo feminino atendidas pela Rede Pública de Saúde do Estado de São Paulo, cujos exames de Papanicolaou foram analisados pelo Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz Central (São Paulo, SP), com idade menor ou igual a 21 anos (adolescentes) ou idade superior a 21 anos (adultas), nos últimos 6 anos (1996 a 2001).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi verificada a freqüência de esfregaços cérvico-vaginais corados pelo método de Papanicolaou, com atipias citológicas em relação ao total de casos examinados por ano, entre os casos examinados pelo Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz entre 1996 e 2001. Em adição, foram extraídos dados obtidos entre 1992 e 1995, em trabalho similar realizado anteriormente pelo Setor de Citologia do Instituto Adolfo Lutz (Uttagawa et al, 1998)<sup>5</sup>, com a finalidade de complementar o estudo da variação na freqüência de achados de atipias citológicas.

As atipias consideradas para seleção foram:

- 1- Atipias de células escamosas de significado indeterminado (conhecida pela sigla inglesa ASCUS ou *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*)

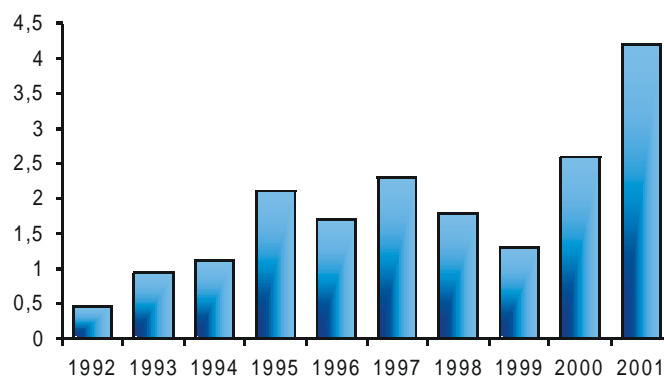
- 2- Atipias de células glandulares de significado indeterminado (conhecida pela sigla inglesa AGUS ou *Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance*)
- 3- Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) graus 1, 2 e 3
- 4- Carcinoma (CA)

Os critérios morfológicos para os diagnósticos acima referidos foram aqueles descritos pela Sociedade Brasileira de Citopatologia (1993)<sup>5</sup>.

Essas alterações foram comparadas em pacientes de duas populações:

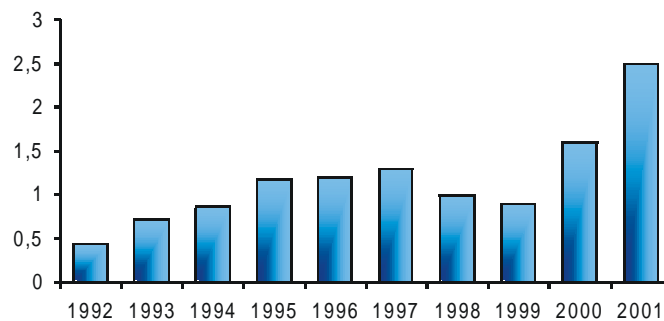
- 1- adolescentes (idade menor ou igual a 21 anos);

**Freqüência de casos com lesões (ASCUS, NIC 1, 2 e 3) em adolescentes**



- 2- e adultas (idade maior de 21 anos).

**Freqüência de casos com lesões (ASCUS, NIC 1, 2 e 3, carcinoma) em mulheres adultas**



## RESULTADOS

Os resultados do presente estudo mostraram que a freqüência de esfregaços com atipias vêm aumentando gradativamente em ambas as populações estudadas nos últimos seis anos, sendo sempre mais alta nas adolescentes (1,7%, 2,3%, 1,8%, 1,3%, 2,6% e 4,2%, respectivamente). Nas mulheres adultas, as lesões também sofreram progressivo aumento com

o passar dos anos, com ocorrência de 1,2%, 1,3%, 1,0%, 0,9%, 1,6% e 2,5%, respectivamente.

Na população de adolescentes, não houve nenhum caso de carcinoma, e o achado de NIC 1 foi o mais freqüente em todos os anos. Na população de adultas, os achados foram semelhantes, exceto pela presença de casos de carcinoma.

Em estudo anterior, também analisando esfregaços cérvico-vaginais nas populações de adolescentes e adultas atendidas pelo Instituto Adolfo Lutz (Utagawa et al, 1998)<sup>7</sup>, já havia sido verificado um aumento progressivo na freqüência de lesões detectadas pelo método de Papanicolaou ao longo de 10 anos (1987 a 1995) em ambas as populações, porém maior na população de adolescentes: estas freqüências variaram de 0,64% em 1987 a 2,1% em 1995 nas adolescentes e de 0,37% em 1987 a 1,18% em 1995 nas adultas.

A população feminina atendida pelo Setor de Citologia do Instituto Adolfo Lutz tem sido sempre a mesma, isto é, mulheres atendidas pelo Programa de Saúde da Mulher da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Desta forma, crescendo mais 4 anos ao presente estudo (1992 a 1995) de acordo com as freqüências obtidas por Utagawa et al (1998)<sup>7</sup>, a diferença na freqüência de casos com atipias citológicas ao longo dos anos foi mais notável, como pode ser observado nos gráficos 1 e 2. Na população de adolescentes, esta freqüência variou de 0,45 a 4,25% de 1992 a 2001, representando aumento em torno de 10 vezes. A análise estatística mostrou uma tendência a aumento linear significativa ( $p=0.0049$ ;  $slope=0,282 \pm 0,0734$ ; coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,8054). Foram mais freqüentes os casos de NIC 1, e não houve nenhum caso de carcinoma. Na população de adultas, esta freqüência variou de 0,44 a 2,54% de 1996 a 2001, representando aumento em torno de 5 vezes. A análise estatística mostrou uma tendência a aumento linear significativa ( $p=0.0049$ ;  $slope=0,154 \pm 0,0391$ ; coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,8119;  $r^2=0,06592$ ). Foram mais freqüentes os casos de NIC 1; a porcentagem máxima de casos de carcinoma por ano foi de 4%. A comparação entre as duas populações (teste  $t$  não pareado) mostrou que a tendência a aumento linear foi maior no grupo de adolescentes ( $p<0,0001$ ).

## DISCUSSÃO

Há uma estreita relação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer do colo uterino, a partir de suas

lesões precursoras, especialmente se envolvem infecção por subtipos de HPV de alto risco [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58]<sup>8</sup>.

A zona de transformação da cérvix (JEC), na qual as células colunares podem sofrer metaplasia escamosa, está mais exposta durante a adolescência do que na vida adulta. Esta área é mais susceptível à infecção por agentes patogênicos de transmissão sexual, inclusive pelo HPV, sendo a área a partir da qual originam-se a maior parte das lesões precursoras e carcinomas cervicais. A menor produção de muco cervical, que pode atuar como uma barreira protetora contra agentes infecciosos, associada à maior área de ectopia cervical em adolescentes, são fatores biológicos de risco para a infecção pelos agentes patogênicos, inclusive o HPV. Respostas imunes incompletas podem também favorecer estas infecções<sup>3</sup>. Segundo Hein et al <sup>2</sup>, as lesões precursoras do câncer do colo uterino progredem mais rapidamente em mulheres muito jovens.

Os fatores acima apontados mostram a importância do exame de prevenção do câncer do colo uterino, não só na população de mulheres adultas, mas também na de adolescentes sexualmente ativas.

Os resultados do presente estudo mostram que a freqüência de achados de esfregaços cérvico-vaginais com atipias, vem aumentando progressivamente ao longo dos últimos anos, e em maior proporção na população de adolescentes. Embora na população mais jovem, a freqüência de lesões mais graves tenha sido baixa, e nenhum caso de carcinoma invasor tenha sido registrado entre adolescentes, devendo-se salientar que apenas 20% da população feminina no Estado de São Paulo realiza exame periódico de prevenção do câncer do colo uterino, segundo estimativas da Secretaria da Saúde, Programa de Saúde da Mulher (1997)<sup>6</sup>. É possível que esta porcentagem seja ainda menor em alguns dos outros Estados do país. Assim, aquelas mulheres que ainda não estão envolvidas no Programa de Saúde da Mulher, correm maior risco de progressão de lesões não diagnosticadas, para carcinoma invasor.

A maior freqüência de lesões precursoras do câncer do colo uterino na população de adolescentes, envolve fatores não apenas biológicos, mas também culturais e sociais. A falta de uma adequada educação sexual e uma visão demasiadamente liberal da sexualidade, muitas vezes incentivada pelos meios de comunicação, acarreta conseqüências em Saúde Pública, como fica patente nos resultados obtidos no presente estudo.



Longatto Filho, A. et al - Frequency of abnormal uterine cervix smears from adolescents and adult women: review of 308,630 cases São Paulo State, Brazil *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 31 - 34 ,2003.

**ABSTRACT.** The aim of the present study was to ascertain the frequency of abnormal PAP smears (ASCUS, AGUS, SILs and carcinoma) in two populations that search for the Program of Cervical Cancer Prevention of the Public Health Services of São Paulo State (Brazil) in the last six years (1996 to 2001): adolescents (up to the age of 21 years) and adults (over 21 years). The samples were examined at Division of Pathology of Adolfo Lutz Institute. The frequency of uterine cervix lesions is increasing constantly in both populations but mainly in adolescents (1.7%, 2.3%, 1.8%, 1.3% 2.6% and 4.2% respectively). The adult women also have showed a progressive increasing of the lesions during the period studied: 1.2%, 1.3%, 1.0%, 0.9%, 1.6% and 2.5%, respectively. The addition of data of four anterior years (1992 a 1995) of a similar study previously published, involving the same type of populations, the differences were still further notable if compared to the posterior years: from 1992 a 1995, the frequency of lesions in the adolescent population was 0,45%, 0,95%, 1,12% e 2,10%, and in the adult population was 0,44%, 0,72%, 0,87% e 1,18%, respectively.

Statistical analysis showed a tendency of linear increase in frequency of abnormal PAP smears in both groups, being greater in the adolescent group. Since the progression of intraepithelial lesions to invasive cancer may occur in a period of ten years, the younger sexually active population should be monitored by regular programs for uterine cervix cancer detection.

**KEY WORDS.** Papanicolaou test, cervical cancer cervix, adolescents

---

#### REFERÊNCIAS

1. Edelman M, Fox AS, Alderman AM et al. Cervical Papanicolaou smear abnormalities in inner city Bronx adolescents: prevalence, progression and immune modifiers. *Cancer*, 87: 184-189, 1999.
2. Hein K, Schreiber K, Cohen MI, Koss LG. Cervical cytology: the need for routine screening in the sexually active adolescent. *J Pediatr*, 91: 123-126, 1989.
3. Kahn J. An update on human papillomavirus infection and Papanicolaou smears in adolescents. *Current Opinion Pediatr*, 13: 303-309, 2001.
4. Mount SL and Papillo JL. A study of 10,296 pediatric and adolescent Papanicolaou smears diagnoses in northern New England. *Pediatrics*, 103: 539-545, 1999.
5. Nomenclatura e controle de qualidade nos programas de rastreamento do câncer cérvico uterino. Instituto nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer (Pró-Onco). Sociedade Brasileira de Citopatologia. 1993.
6. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Programa de Saúde da Mulher. Diretrizes para atuação no Estado de São Paulo. Maio de 1997.
7. Utagawa ML, Pereira SSM, Cavaliere MJ, Maeda MYS, Shih LWS, Shirata NK. Cervical intraepithelial neoplasia in adolescents: study of cytological findings between 1987 and 1995 in São Paulo State – Brazil. *Arch Gynecol Obstet*, 262: 59-64,1998.
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *J Pathol*, 189: 12-19, 1999.

Recebido em 28/10/2002 ; Aprovado em 29/04/2003

# Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida

## Cellularity evaluation in liquid-based cytology preparations

Sonia M. M. PEREIRA<sup>1\*</sup>  
Maria Lúcia UTAGAWA<sup>1</sup>  
Janaina E. PITTOLI<sup>1</sup>  
Luciana S. AGUIAR<sup>1</sup>  
Marina Y. S. MAEDA<sup>1</sup>  
Adhemar LONGATTO FILHO<sup>1</sup>  
Celso di LORETO<sup>1</sup>  
Cecília ROTELI-MARTINS<sup>2</sup>  
Janice O. GALVANE<sup>2</sup>  
Cláudia Maria WOLF<sup>2</sup>  
Sonia F. FIGUEIREDO<sup>2</sup>  
Kari SYRJANEN<sup>3</sup>

RIALA6/937

Pereira, S. M. M. et al - Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 35 - 39 ,2003.

**RESUMO.** O método de citologia em base líquida parece apresentar uma série de vantagens em relação ao convencional: melhor disposição celular, facilitando a interpretação; redução do número de hemácias, exsudato inflamatório e muco, preparação de lâminas adicionais do mesmo caso sem ter que se convocar a paciente; utilização de material residual para testes moleculares para identificação de HPV e outros microorganismos. O método de base líquida, pelas vantagens mencionadas, detecta maior número de lesões, além de menor índice de amostras inadequadas ou limitadas por alguma razão. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os achados citológicos obtidos com duas metodologias diferentes de preparo de citologia em base líquida, o novo sistema DNA - CITOLIQ (DIGENE-Brasil) e o sistema Autocyte (TRIPATH, USA), e correlacioná-los com os achados de citologia convencional obtidos da rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz. Foram estudadas 509 amostras consecutivas pelo sistema DNA - CITOLIQ e 398 amostras pelo sistema Autocyte, de mulheres atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros no ano de 2002, participantes voluntárias do projeto INCODEV ICA4-CT-2001-(10013). Das 509 citologias preparadas pelo método DNA - CITOLIQ (DIGENE-Brasil), 0,6% foram insatisfatórios; 89,3% negativos; 2,0% lesões de baixo grau; 0,8% lesões de alto grau; 0,2% carcinoma e 7,1% ASCUS / AGUS. Apresentou ainda 89% de amostras satisfatórias, 10,0% satisfatórias mas limitadas por ausência de JEC e 0,4% limitadas por outras causas. Pelo método Autocyte, em 398 casos, 0,5% foram insatisfatórios; 88,2% negativos; 3,0% ASCUS / AGUS; 6,8% lesões de baixo grau e 1,5% lesões de alto grau. Apresentou 84% de amostras satisfatórias, 15,25% satisfatórias mas limitados por ausência de JEC e 0,25% satisfatórias mas limitados por outras causas. Foram examinadas 33.313 citologias colhidas pelo método convencional em 2001, onde 5,0% foram insatisfatórios; 92,6% negativos; 1,3% lesões de baixo grau; 0,3% lesões de alto grau e 0,05% de carcinoma invasivo; 0,7 ASCUS / AGUS. Em relação à qualidade da amostra, apenas 22,7% dos casos apresentaram células da JEC. Conclui-se que ambos métodos de citologia em base líquida apresentaram performances semelhantes quanto à qualidade das amostras, com menos casos insatisfatórios que o convencional. Observamos ainda, para ambos métodos, aumento significativo na sensibilidade para detecção de lesões intraepiteliais, sobretudo as de baixo grau, quando comparadas ao método convencional.

**PALAVRAS – CHAVE.** Citologia de base líquida, HPV, esfregaço cérvico-vaginal.

<sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, <sup>2</sup>Hospital Leonor Mendes de Barros, São Paulo, SP; <sup>3</sup>Istituto Superiore di Sanità, Roma Itália.

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Divisão de Patologia - Av. Dr. Arnaldo, 351 -7º andar  
CEP: 01246-902 – São Paulo – SP – Brasil – e-mail : mirandasmp@ig.com.br

## INTRODUÇÃO

A citologia de base líquida surgiu para atender às demandas de escrutínio computadorizado. Para viabilizar a leitura das lâminas por computadores, era necessário um preparado que apresentasse o menor número possível de artefatos e sobreposições celulares; dessa forma, os preparados citológicos em base líquida foram chamados a princípio de citologia de mono camada ou camada fina<sup>1,2</sup>.

O número de células em meio líquido é considerado ideal, uma vez que ao ser acomodado no recipiente, a quase totalidade das células coletadas são transferidas ao meio. Ao se preparar as amostras, essas células são randomizadas por agitação (independente dos métodos disponíveis no mercado) e oferecem, teoricamente, uma amostra mais representativa. Essa metodologia traz um grande avanço no preparo citológico, uma vez que há evidências de que apenas 20% do material colhido pelo método convencional é transferido para a lâmina; o restante, que está aderido à escova/espátula, é descartado<sup>1</sup>. Além disso, tem sido advogado que a citologia de base líquida apresenta uma série de vantagens em relação a citologia cervical convencional, como características citomorfológicas nítidas e de fácil interpretação, melhor disposição celular (distribuição homogênea), menor área de análise. Há, também, evidente redução do número de hemácias, exsudato inflamatório, muco e preparo de lâminas adicionais do mesmo caso sem ter que convocar a paciente e utilização do material residual para testes moleculares para identificação de agentes etiológicos, como o HPV<sup>3,4</sup>.

A citologia de base líquida é o resultado de mais de uma década de pesquisas, onde se buscou um único meio, com condições de preparo citológico de excelência em fixação, preservação celular e de moléculas proteicas e ácidos nucleicos para estudos biomoleculares<sup>1</sup>.

Associada a preservação celular, alguns parâmetros ainda continuam sendo valorizados para o reconhecimento da qualidade de uma amostra como a presença de células da junção escamo-colunar (JEC)<sup>5,6,7</sup>, e por isso sua presença em meio líquido também tem sido avaliada.

Tem sido relatado também que a citologia de base líquida, pelas vantagens mencionadas, detecta maior número de lesões, além de apresentar reduzidos índices de amostras insatisfatórias ou limitadas por alguma razão<sup>8,9,10</sup>.

Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho diagnóstico e adequabilidade das amostras de duas metodologias diferentes de preparo de citologia em base líquida e compará-los com os achados de citologia convencional obtidos junto à rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 907 amostras cérvico-vaginais consecutivas preparadas em base líquida, sendo 509 amostras pelo sistema DNA -CITOLIQU® e 398 pelo sistema Autocyte, de mulheres atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros no

ano de 2002 participantes voluntárias do projeto INCODEV ICA4-CT-2001-(10013).

O Sistema DNA-CITOLIQU® (Digene-Brasil) consiste de um kit de coleta composto por um tubete com 1ml de solução Universal Collection Medium (UCM) e escova. Após a coleta, a escova é colocada dentro do frasco com líquido preservante, quebrando-se a haste da mesma. No laboratório, o tubo com a amostra é homogeneizado em vórtex por 20 segundos; 200µl da amostra são alíquotados e dispensados de maneira uniforme sobre a superfície de uma membrana acomodada em sistema de *imprint* com capacidade para 12 lâminas. O preparado ocupa uma área circular de 25mm de diâmetro. A tampa do suporte do sistema é fechada com o conjunto lâmina/membrana e travada por 10 segundos.

O processo do Sistema Autocyte (Tripath;USA), é composto por um kit com 10 ml de solução preservante e uma escova do tipo Rover's. O frasco é homogeneizado em vórtex, formando uma suspensão randomizada de células. Essa suspensão é removida do frasco de coleta e colocada sobre um líquido de densidade alta dentro de um tubo plástico de centrifugação. O tubo é centrifugado, e o sobrenadante é removido e descartado. O "pellet" é suspenso com 4ml de água deionizada. Dessa solução é retirado 800µl e alocada dentro de uma câmara de assentamento. Após fixação e secagem, as lâminas são coradas. A amostra é distribuída uniformemente sobre uma área de 13 mm de diâmetro.

Para ambos métodos, as lâminas são fixadas imediatamente em álcool absoluto e coradas pelo Método de Papanicolaou.

Todos os casos foram analisados em estudo cego por quatro dos autores (SMMP, MLU, MYSM, ALF). Casos insatisfatórios, suspeitos e positivos foram discutidos por pelo menos três observadores e as discrepâncias resolvidas em reunião de consenso em microscópio de múltipla observação com um citopatologista (CL).

Os resultados obtidos foram comparados com os de 33.313 esfregaços de citologia convencional do ano de 2001 realizado na rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz

Os resultados do exame de Papanicolaou foram classificados de acordo com o Sistema de Bethesda<sup>11</sup>.

## RESULTADO

A tabela 1 apresenta os percentuais diagnósticos observados nos sistemas de base líquida analisados e no método convencional. Observa-se marcante predomínio de amostras insatisfatórias no método convencional (5%) representando quase 10 vezes mais em relação as observadas em base líquida, independente do sistema.

Os percentuais diagnósticos observados mostram aumento de lesões detectadas pela citologia em meio líquido, onde as LSIL (lesões intraepiteliais de baixo grau) e as HSIL (lesões intraepiteliais de alto grau) também foram mais frequentes do que em esfregaços convencionais.

**TABELA 1-** Comparação dos dois Sistemas de base líquida com o método convencional.

Diagnóstico	DNA - CITOLIQ (%) n=509	AUTOCYTE (%) n=398	CONVENCIONAL (%) n=33.313
Insatisfatório	0,6	0,5	5
Negativo	89,3	88,2	92,6
Ascus/Agus	7,1	3	0,7
LSIL	2,0	6,8	1,3
HSIL	0,8	1,5	0,3
Carcinoma	0,2	-	0,05

A tabela 2 apresenta um quadro comparativo de qualidade da amostra entre os métodos DNA - CITOLIQ e Autocyte. Nestes, podemos observar semelhanças quanto ao número de casos satisfatórios que chegam a 89% no DNA - CITOLIQ e 84% no Autocyte.

A ausência das células da junção escamo-colunar (JEC) também foi de 10% no sistema DNA - CITOLIQ e 15,25% no Autocyte.

O método convencional apresentou no período analisado, 22,7% de casos com células da JEC.

Mesmo com a introdução de novos instrumentos de coleta como o uso de escovas para a região endocervical, não temos observado aumento de células da JEC no preparado convencional que seja comparável ao observado em base líquida como nesta amostra. Sabemos que esta limitação do método convencional pode estar diretamente relacionada à alta frequência de resultados falso negativos.

Uma outra questão a ser avaliada no método convencional é a amostra insatisfatória. O estudo de Fagundes<sup>15</sup> mostrou que 4,39% das amostras convencionais foram

**TABELA 2-** Comparação dos Sistemas de base líquida com a amostragem.

Amostragem	DNA - CITOLIQ (%) n=509	AUTOCYTE (%) n=398
Satisfatório	89,0	84,0
limitado por ausência da JEC	10,0	15,25
limitado por outras causas	0,4	0,25

As alterações morfológicas das lesões intraepiteliais encontrados em ambos métodos de base líquida foram as mesmas preconizadas para a citologia convencional.

### DISCUSSÃO

Existem estudos que demonstram a importância da representação celular da JEC, como um parâmetro fundamental para a otimização do diagnóstico citológico de amostras cérvico vaginais<sup>5,6,7,12</sup>. A citologia de base líquida tem sido referida como método de performance superior em relação à citologia convencional<sup>13</sup>. Assim Bishop<sup>14</sup>, em análise preliminar concluiu que a base líquida obtém uma melhor representação celular da JEC com sensibilidade superior para a detecção de lesões do que o preparado convencional.

Neste estudo fica claro que os preparados em base líquida oferecem vantagens técnicas importantes em relação à adequação das amostras pois nos métodos de base líquida a JEC esteve representada em 89% e 84% das amostras (DNA - CITOLIQ e Autocyte), enquanto no método convencional a representatividade foi de apenas 22,7%.

classificadas insatisfatórias e destas 55,4% devido a problemas de fixação. Os nossos resultados mostram que nas citologias em base líquida as amostras insatisfatórias corresponderam à cerca de 0,5%, independente do sistema utilizado. Nosso índice de insatisfatórios em casos convencionais é de 5%, semelhante aos dados da literatura. Com a metodologia em base líquida, não observamos problemas com relação à fixação. Após a coleta, a amostra é colocada imediatamente em líquido preservante; o preparado é confeccionado e fixado no laboratório, não havendo interferências nesse sentido.

A diferença de frequências de lesões do colo uterino deve ser avaliada com cuidado. A uma primeira análise, o exame convencional não apresentou igual desempenho dos métodos em base líquida. Entretanto, deve-se ressaltar que os casos convencionais avaliados nesse estudo referem-se a uma grande variedade de condições de mulheres atendidas em um sistema de prevenção de câncer da rede pública. Já as mulheres atendidas pelo projeto INCODEV, embora não tenham história clínica de lesão de colo uterino, pertencem a um único ambulatório especializado em atendimento a mulher. Essa diferença de população alvo pode ter induzido, em parte, as diferenças

encontradas nas frequências das lesões do colo uterino. Outra variável a ser considerada é a baixíssima frequência de células da JEC na casuística convencional, em diferentes coletas, e que pode, também, ter influenciado os diagnósticos. Essas diferenças, porém, não justificam a deficiência dos preparados convencionais em relação ao de base líquida no que se refere à qualidade das amostras.

O parâmetro de qualidade em relação a coleta também deve considerar a grande variabilidade dos profissionais que atuam junto a Rede. No hospital Leonor Mendes de Barros, o corpo de profissionais é estável; eventuais não conformidades podem ser diretamente discutidas entre os interessados e ações corretivas podem ser implementadas de imediato. Os ambulatórios da Rede Pública apresentam maior mobilidade de seus quadros influenciando negativamente na eficácia das ações de treinamento e educação continuada. Apesar disso, anualmente cerca de 1000 profissionais de enfermagem são

treinados pela Fundação Oncocentro para otimizar as ações de qualidade na Rede Pública de Saúde mostrando que há melhoria quando há treinamento (Fundação Oncocentro, São Paulo, 2002 – dados não publicados).

Fica-nos claramente a impressão de que os preparados de base líquida oferecem melhor qualidade quando diminuí drasticamente os casos insatisfatórios e com limitações, sobretudo relacionados à presença de células glandulares. As dimensões e a limpeza do preparado em base líquida também oferecem maior conforto visual ao observador e restringem a área de observação aumentando a chance de observação de alterações celulares.

Embora o esfregaço convencional ainda seja preconizado para o escrutínio de lesões de colo uterino em grandes populações, parece-nos evidente a vocação dos preparados de base líquida para otimizar qualitativamente o teste de Papanicolaou.

RIALA6/937

---

Pereira, S. M. M. et al - Cellularity evaluation in liquid-based cytology preparations. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 35 - 39,2003.

**ABSTRACT.** Liquid-based cytology (LBC) presents several advantages when compared to the conventional smears, such as clean background, residual material for additional cytological preparations or even for molecular tests to infectious agents identification, mainly HPV. Besides these advantages, LBC detects more lesions than the conventional smears, and also reduce the number of unsatisfactory samples and false negative cases. The goal of this work was to evaluate the cytologic findings of two different LBC methodologies, DNACITOLIQ<sup>®</sup> (DIGENE-Brasil) and Autocyte system (Tripath, USA) concerning the adequacy of the samples and diagnosis performance, and compare these results to those reported by conventional smears daily routine analyzed at Adolfo Lutz Institute. A total of 509 samples of DNA- CITOLIQ<sup>®</sup> and 398 Autocyte consecutive cases from women examined at Leonor Mendes de Barros Hospital in 2002 (INCODEV ICA-CT-2001-10013 project) were analyzed. From DNACITOLIQ<sup>®</sup> cases 0.6% were unsatisfactory, 89.3% were negative, 7,1% ASCUS/ AGUS, 2.0% LSIL, 0.8% HSIL and 0.2% squamous carcinoma. Regarding adequacy parameters 89% were satisfactory, 10.0% were limited by absence of glandular cells and 0.4 limited by other reasons. Autocyte system diagnosis were: 0.5% unsatisfactory, 88.2% negative, 3.0% ASCUS/AGUS, 6.8% LSIL and 1.5% HSIL. Conventional smears comprised 33,313 samples where 5.0% were unsatisfactory, 92.6% were negative, 0.7% ASCUS/ AGUS, 1.3% LSIL, 0.3% HSIL and 0.05% squamous carcinoma. Satisfactory samples with glandular cells representation account 22.7%. Both methods of liquid-based cytology have presented similar performances regarding the adequacy of the samples, presenting lesser inadequate cases than the conventional. We have also observed that both methods have showed better sensitivity than the conventional to identify intraepithelial lesions, mainly the low grade.

**KEY WORDS.** Liquid-based cytology, HPV, cervical smears

---

## REFERÊNCIAS

1. Velasco J Citología Líquida. **VPH Hoje**. 1: 8-9, 2001.
2. Takahashi M; Naito M. Application of the cytorich monolayer preparation system for cervical cytology: a prelude to automated primary screening. **Acta Cytol**; 41:1785-1789, 1997.
3. Gupta PK et al. Processing liquid-based gynecologic specimens; comparison of the available techniques. **Acta Cytol** ; 45: 995-998, 2001.
4. Bernstein SJ.; Sanchez-ramos L.; Ndubisi B. Liquid – based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. **Am J Obstet Gynecol** ; 185: 308-17, 2001.
5. Mitchell H, MEDLEY G. Cytological reporting of cervical abnormalities according to endocervical status. **Br J cancer** 67: 585-588, 1993
6. Aurier P et al . Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uterine. **BJ Cancer** 74: 488-490, 1996.
7. Shirata NK et al. Celularidade dos esfregaços cervicovaginais: importância em programas de garantia de qualidade em citopatologia. **J bras Ginec** 108(3): 63-66, 1998.
8. Marino JF; Fremont-Smith M. Direct-to-vial experience with AutoCyte PREP in a small New England regional cytology practice. **J.Reprod Med**, 46(4): 353-358, 2001.
9. Biscotti CV et al. Thin-layer test vs. conventional Pap smear. Analysis of 400 split samples . **J.Reprod Med**, 47(1): 9-13, 2002.
10. Tench W. Preliminary assessment of the AutoCyte PREP. Direct-to-vial performance. **J.Reprod Med**, 45(11): 912-916, 2000.
11. Solomon D et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**; 287(16), 2002.
12. Germain M et al. A comparison of the three most common Papanicolaou smear collection techniques. **Obstet Gynecol**; 84: 168-173, 1994.
13. Lee KR et al. Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin layer system for cervical cancer screening. **Obstet Gynecol**; 90:278-284, 1997.
14. Bishop JW. Comparison of the CytoRich system with conventional cervical cytology. Preliminary data on 2032 cases from a clinical trial site. **Acta Cytol**; 41: 15-23, 1997.
15. Fagundes MCS et al. Amostra inadequada em Screening cérvico-vaginal. As principais causas. **Laes Haes**; 128, 94-100, 2000.

Recebido em 28/10/2002 ; Aprovado em 29/04/2003



## Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e fungos filamentosos. II. Geléias de frutas

### Standardization of method and quantification of extraneous materials and mycelial of molds. II. Fruit jams.

Marlene CORREIA <sup>1</sup>  
Maria José RONCADA <sup>2</sup>

RIALA6/938

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): 41 - 48 ,2003.

**RESUMO.** As geléias de frutas, assim como outros produtos alimentícios de origem vegetal, podem apresentar, como contaminantes, matérias estranhas e hifas de fungos fragmentadas, quando é utilizada matéria-prima inadequada ou não são adotadas boas práticas de fabricação. O objetivo do presente trabalho foi padronizar procedimentos analíticos para quantificação de filamentos micelianos de fungos totais e de *Geotrichum*, e de matérias estranhas em geléias de frutas e avaliar tais contaminantes em 117 amostras colhidas em supermercados da cidade de São Paulo. Foram adotados os métodos da Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). Como resultado da padronização, foi estabelecida a diluição 1+6 para as geléias de abacaxi, ameixa, figo e uva na contagem Howard de filamentos micelianos. Quanto aos resultados das análises, 56,4% das amostras continham matérias estranhas (principalmente fragmentos de insetos); 73,0% filamentos micelianos pela contagem Howard (máximo de 83% de campos positivos) e 23,0% estavam positivas para hifas de *Geotrichum*. As geléias de abacaxi e de ameixa apresentaram menor número de amostras com os contaminantes estudados. Considerando-se a legislação de alimentos em vigor, os produtos estudados apresentaram alto índice de contaminação por filamentos micelianos e matérias estranhas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Geléia de frutas; análise microscópica; matérias estranhas; fungos.

#### INTRODUÇÃO

A Portaria nº 1.428/93<sup>6</sup>, determina que as indústrias processadoras de alimentos adotem programas de Boas Práticas de Produção, visando uma melhor qualidade dos produtos alimentícios que, juntamente com o Código de Defesa do

Consumidor, Lei nº 8.078/90<sup>5</sup> e a legislação de alimentos, atuam na proteção da saúde do consumidor

De acordo com a legislação de alimentos em vigor geléia de frutas “é o produto obtido pela cocção de frutas inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, com açúcar e água e concentrado até consistência gelatinosa”. “O produto deverá

<sup>1</sup>Seção de Microscopia Alimentar, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Av.Dr. Arnaldo, 355, CEP.: 01246-902, e-mail: mcorreia@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.



ser preparado de frutas sãs e limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitos, de detritos animais ou vegetais, e de fermentações ...". Deve haver "ausência de sujidades, parasitos e larvas"<sup>3,4,15</sup>.

As matérias estranhas (insetos, ácaros e pêlos de animais, entre outros) quando presentes em ambientes industriais, ou mesmo em utensílios e equipamentos desses estabelecimentos, podem se integrar aos produtos, contaminando-os, além de provocar alterações das características sensoriais e rejeição pelo consumidor.

Insetos, como moscas e baratas, assim como ratos, camundongos e pássaros, devem ser considerados como fatores de risco quando presentes em locais de manipulação de alimentos e o seu controle e eliminação devem ser realizados, através do emprego de Boas Práticas de Fabricação<sup>14</sup>. A presença de pêlos, como os de roedores que são potenciais transmissores de uma série de doenças como a leptospirose e a salmonelose<sup>7,16,19</sup>, indica ter havido contato do produto com o animal, excrementos ou urina dos mesmos<sup>19</sup>.

Outro contaminante que pode estar presente nos produtos são os fungos, que tem o desenvolvimento nas frutas facilitado pela utilização de equipamentos inadequados na colheita, uso de água contaminada para a lavagem, armazenamento em locais sujos ou, ainda, por lesões do epicarpo causadas pelo contato com superfícies irregulares de equipamentos de lavagem e seleção<sup>17</sup>. Após o processamento das frutas as hifas dos fungos permanecem no produto de forma fragmentada, a contagem de filamentos micelianos pode ser utilizado como indicador da qualidade da matéria-prima utilizada, ou mesmo, das condições de processamento<sup>18</sup>.

Como a "Association of Official Analytical Chemists International" (AOAC International)<sup>1</sup> estabelece método para contagem de filamentos micelianos (método Howard) em produtos de diversas frutas mas não para abacaxi, ameixa, figo e uva, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivos de padronizar procedimento analítico para contagem de filamentos micelianos em geléias de abacaxi, ameixa, figo e uva e de verificar a contaminação das geléias industrializadas e comercializadas em supermercados da Cidade de São Paulo, quanto à presença de matérias estranhas e de hifas de fungos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostragem

Para a padronização do método Howard para contagem de filamentos micelianos em geléias de frutas foram colhidas, em supermercados da Cidade de São Paulo, 40 amostras-teste sendo 4 de cada tipo de fruta (abacaxi, ameixa, amora, damasco, figo, framboesa, goiaba, morango, pêssego e uva).

Para verificar as condições higiênicas das geléias, no período de abril/98 a janeiro/99, foram colhidas amostras de geléias de frutas de todas as marcas e tipos de frutas (com

exceção das importadas) comercializadas nas principais redes de supermercados da Cidade de São Paulo. Foram realizadas 3 colheitas de amostras de mesma marca e com números de lote/datas de fabricação e/ou validade diferentes em cada colheita; como o número de indústrias fabricantes foi diferente para cada tipo de geléia, das 117 amostras colhidas 3 foram de figo; 6 de abacaxi, ameixa, damasco e pêssego; 9 de framboesa; 12 de amora; 18 de uva; 24 de goiaba e 27 de morango.

## 2. Métodos

### 2.1. Matérias estranhas

Para o ensaio de matérias estranhas (sujidades) em geléias de frutas foi utilizado o método 16.10.06/950.89a da AOAC<sup>1</sup>:

Homogeneizar a amostra e pesar 100 g em frasco armadilha de 1000 mL. Adicionar 200 mL de água filtrada a 50°C e mexer com a haste do frasco. Adicionar 10 mL de HCl, mexer, suspender a haste e prendê-la. Ferver o material em chapa aquecedora durante 5 min. Esfriar até a temperatura ambiente. Adicionar 25 mL de heptano e agitar em agitador magnético, durante 5 min. Completar o volume do frasco com água filtrada e mexer, com a haste, em intervalos de 5 min, durante 20 min. Deixar em repouso 10 min. Extrair em béquer de 400 mL, lavar o gargalo e a haste do frasco com água filtrada e coletar no mesmo béquer. Filtrar a vácuo o material do béquer, sobre papel de filtro riscado.

As matérias estranhas extraídas e retidas no papel de filtro foram identificadas e quantificadas ao microscópio estereoscópico, com aumento de 30 vezes.

Os insetos e ácaros foram montados em lâminas utilizando-se líquido clarificante de Hoyers<sup>9</sup>, cobertas com lamínulas e mantidas em estufa a 40 °C por 48 h (para secagem e diafanização) e, em seguida, procedeu-se a identificação de acordo com a literatura específica<sup>2,8,9,10,11,12</sup>.

Os pêlos de animais foram montados em lâminas (como no procedimento descrito acima) e identificados observando-se as estruturas da raiz, cutícula, córtex e medula<sup>19</sup>.

### 2.2. Contagem Howard

Para a contagem Howard em geléias de frutas foi utilizada a técnica 16.18.05/982.33AdB (AOAC)<sup>1</sup>. Neste método, após a etapa de centrifugação da amostra o sedimento obtido deve ser diluído com solução a 0,5% de carboximetilcelulose na proporção de: pêssego e damasco (1+1), goiaba (1+3), amora, framboesa e morango (1+6). Como não estabelece a diluição que deve ser usada para geléias de abacaxi, ameixa, figo e uva, foi adotado como parâmetro o teor de sólidos solúveis da amostra ou grau Brix (°Brix), medido em refratômetro e baseando-se nos valores de °Brix obtidos após as diluições dos sedimentos das amostras-teste das geléias de frutas descritas acima.

Foram testadas diferentes diluições com solução a 5% de carboximetilcelulose do sedimento das amostras de geléias de abacaxi, ameixa, figo e uva, para a obtenção de valores de

°Brix em intervalo semelhante àquele das frutas padronizadas no método citado. Foi padronizada a alíquota da amostra em 50 g.

O preparo das lâminas e a contagem foram realizados segundo o método 16.17.01/984.29ABC da AOAC<sup>1</sup>. Para cada duplicata foram contados 75 campos (3 montagens com 25 campos cada uma) e o número de filamentos micelianos foi calculado por:

$$N = \frac{\text{n}^\circ \text{ de campos positivos} \times 100}{75}$$

onde: N = percentual de campos positivos para filamentos micelianos

Nas análises das 117 amostras comerciais para avaliar a contaminação por filamentos micelianos foram utilizados o método e as diluições propostas neste estudo:

Homogeneizar a amostra e pesar 50 g em béquer de 400 mL. Adicionar 150 g de água filtrada e mexer com bastão de vidro para dispersar a amostra. Misturar bem o material do béquer e transferir 40 ml para tubo cônico de centrífuga graduado de 50ml. Centrifugar a 2.200 rpm por 10 min. Deixar a centrífuga parar espontaneamente e retirar os tubos. Decantar o sobrenadante sem mexer o sedimento. Ler o volume do sedimento e diluir com solução de carboximetilcelulose, de acordo com a fruta: 1+1: pêssego e damasco; 1+3: goiaba, 1+6: amora, framboesa, morango, abacaxi, ameixa, figo e uva.

Contagem: com espátula, colocar quantidade adequada de material homogeneizado no centro da câmara de Howard e cobrir com a lamínula. Contar 3 montagens de 25 campos cada, em microscópio óptico com aumento de 90 a 125x. Para produtos diluídos 1+1 dividir o n° de campos positivos por 2, antes de calcular o percentual de fungos.

### 2.3. Contagem de *Geotrichum*

As análises das amostras de geléias de frutas foram preparadas segundo o procedimento 16.19.13/982.34AdB (AOAC)<sup>1</sup>:

Homogeneizar a amostra, pesar 50 g em béquer de 400 mL e adicionar 150g de água filtrada. Misturar bem, transferir 40 ml para tubo cônico de centrífuga graduado de 40ml, adicionar 10 gotas de solução de cristal violeta e misturar. Centrifugar 10 min a 2200 rpm. Imediatamente após a parada da centrífuga, retirar os tubos, decantar o sobrenadante e ler o volume do sedimento. Diluir o sedimento na proporção 1+3 (v/v) com solução de carboximetilcelulose.

O preparo das lâminas, a contagem e o cálculo do número de filamentos micelianos de *Geotrichum* foi realizado segundo o método 16.19.09/984.30ABC da AOAC<sup>1</sup>.

Para cada amostra, em duplicata, foram preparadas 2 lâminas, pipetando 0,5 mL do material em cada uma (utilizando

pipeta de 1 mL cortada na marca 0,9 mL) e a contagem dos filamentos micelianos foi realizada em microscópio estereoscópico, com luz transmitida, e aumento de 30 a 45 vezes. Somente foram contadas as hifas com 3 ou mais ramificações características de *Geotrichum* (hifas com ramificações regulares e em 45°, aparentando uma pena)<sup>1</sup>.

O número de filamentos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$N = S \times 100$$

onde:

N = número de filamentos micelianos/100 mL de preparação

S = total dos filamentos micelianos contados nas 2 lâminas

Para as três determinações, os resultados foram expressos como a média aritmética dos valores encontrados nas duplicatas.

As análises foram realizadas na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Matérias estranhas

Na Tabela 1 observa-se que 56,4% das amostras de geléias de frutas apresentaram matérias estranhas, com contaminação em 100% das amostras de geléias de amora e de figo.

**Tabela 1.** Número e percentual de amostras de geléias de frutas contendo matérias estranhas.

Tipos de geléias de frutas	N° de marcas	N° de amostras Analisadas	Amostras positivas	
			N°	%
Abacaxi	2	6	1	16,7
Ameixa	2	6	0	0,0
Amora	4	12	12	100,0
Damasco	2	6	2	33,3
Figo	1	3	3	100,0
Framboesa	3	9	7	77,8
Goiaba	8	24	13	54,2
Morango	9	27	18	66,7
Pêssego	2	6	3	50,0
Uva	6	18	7	38,9
Total		117	66	56,4

Fragmentos de insetos foram encontrados com maior frequência, aparecendo em 15 amostras de geléias de morango e com valor máximo de 17 fragmentos em uma amostra de geléia de goiaba (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de amostras por tipos de matérias estranhas isoladas de geléias de frutas.

Matérias estranhas		Tipos de geléias de frutas									
Tipos	Quantidades	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
N° de amostras											
Inseto	0	5	6	1	6	1	5	24	24	6	16
	1 - 5	1	0	7	0	0	4	0	3	0	2
	6 - 10	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0
Larva	0	6	6	9	6	2	8	23	22	6	16
	1 - 5	0	0	3	0	1	1	1	5	0	2
Exuvia	0	6	6	9	6	2	8	24	25	6	16
	1 - 5	0	0	3	0	1	1	0	2	0	2
Ovo	0	6	6	10	6	3	5	23	25	6	17
	1 - 5	0	0	2	0	0	4	1	2	0	1
Fragmento de inseto	0	6	6	6	5	0	7	13	12	3	13
	1 - 5	0	0	5	1	3	2	7	11	3	1
	6 - 10	0	0	1	0	0	0	3	4	0	4
	11 - 20	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Ácaro	0	6	6	2	6	3	4	24	26	6	15
	1 - 5	0	0	9	0	0	3	0	1	0	3
	6 - 10	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	11 - 20	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pêlo de Roedor	0	6	6	12	5	3	9	24	27	6	18
	1 - 5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Total de amostras		6	6	12	6	3	9	24	27	6	18

A- Abacaxi

B- Ameixa

C- Amora

D- Damasco

E- Figo

F- Framboesa

G- Goiabada

H- Morango

I- Pêssego

J- Uva

Insetos foram isolados em 6 tipos de geléias, com valor máximo de 9 insetos em uma amostra de geléia de figo; ácaros mortos ocorreram em 4 tipos de geléias com uma amostra de geléia de framboesa apresentando 15 ácaros. Somente um pêlo de roedor foi encontrado e em uma amostra de geléia de damasco (Tabela 2).

Os insetos isolados das amostras de geléias de frutas foram identificados como: cochonilha (Homoptera: Coccoidea); afídeo (Hemiptera: Aphididae); tripes (Thysanoptera: Terebrantia); formiga (Hymenoptera) e psocóptero (Psocoptera: Psocidae).

Os ácaros foram identificados como pertencentes às seguintes ordens/famílias: Acariforme (Oribatidae, Tenuipalpidae, Tarsonemidae, Eriophyidae e Tarsonemidae) e Parasitiforme (Mesostigmata, Phytoseidae e Gamasida).

#### Contagem Howard para filamentos micelianos

Os resultados obtidos na padronização da diluição das amostras-teste de geléias de frutas são apresentados na Tabela 3 e representam a média dos valores obtidos nas 4 amostras-teste de cada tipo de doce.

**Tabela 3.** Diluição e °Brix das amostras-teste de geléias de frutas.

Tipos de geléias de frutas	N° de amostras	Diluição	°Brix
Amora	4	1 + 6	3,3
Damasco	4	1 + 1	9,6 *
Framboesa	4	1 + 6	3,3
Goiaba	4	1 + 3	4,0
Morango	4	1 + 6	3,4
Pêssego	4	1 + 1	9,8 *
Abacaxi	4	1 + 6	3,1
Ameixa	4	1 + 6	3,6
Figo	4	1 + 6	3,9
Uva	4	1 + 6	3,4

\* = Para o cálculo do percentual de filamentos de fungos o resultado da contagem deve ser dividido por 2.

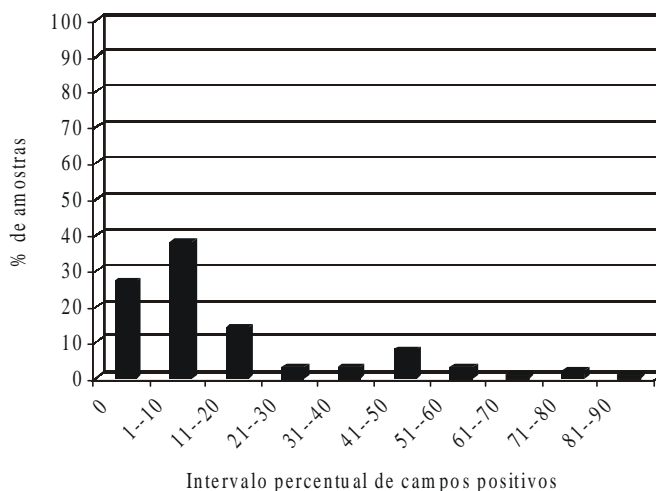
As amostras-teste de geléias de amora, framboesa, goiaba e morango, frutas que têm diluição estabelecida na metodologia adotada, após a diluição do sedimento, apresentaram valores de °Brix entre 3,3 e 4,0 (Tabela 3).

Valores de °Brix 9,6 e 9,8 foram obtidos, respectivamente, para as amostras-teste de geléias de damasco e de pêssego; no entanto, pela metodologia de análise, para o cálculo do percentual de filamentos micelianos o número de campos positivos contados deve ser dividido por 2.

Para as amostras-teste de geléias de abacaxi, ameixa, figo e uva, cuja diluição não está estabelecida, os ensaios realizados indicaram ser a diluição do sedimento na proporção 1+ 6 a mais adequada, por apresentar valores de °Brix entre 3,1 e 3,9 e, assim, em intervalo semelhante ao das frutas padronizadas na metodologia da AOAC (Tabela 3). Tal diluição foi utilizada na análise das amostras para verificação das condições higiênicas.

Os resultados da Figura 1 mostram que em apenas 27% das amostras de geléias não foram observados filamentos micelianos e o maior percentual de amostras positivas (38%) pertence ao intervalo compreendido entre 1 e 10%.

As geléias de amora, goiaba e uva apresentaram os maiores percentuais de campos positivos com filamentos de fungos (Tabela 4). Embora houvesse resultados positivos até o máximo de 83% (intervalo compreendido entre 81 e 90%), a média obtida de percentuais de campos



**Figura 1.** Percentuais de amostras de frutas em calda quanto à contagem de filamentos micelianos, pelo método Howard.

positivos para fungos considerando-se as 117 amostras, foi de 13,8%.

A maior contaminação por fungos nas amostras de geléias de goiaba e de uva indica haver um processo de seleção deficiente para estas frutas na fase de industrialização ou, ainda, manipulação ou estocagem inadequadas das polpas utilizadas como matéria-prima.

**Tabela 4.** Números e percentuais de amostras por tipos de geléias de frutas, quanto à contagem Howard para filamentos micelianos.

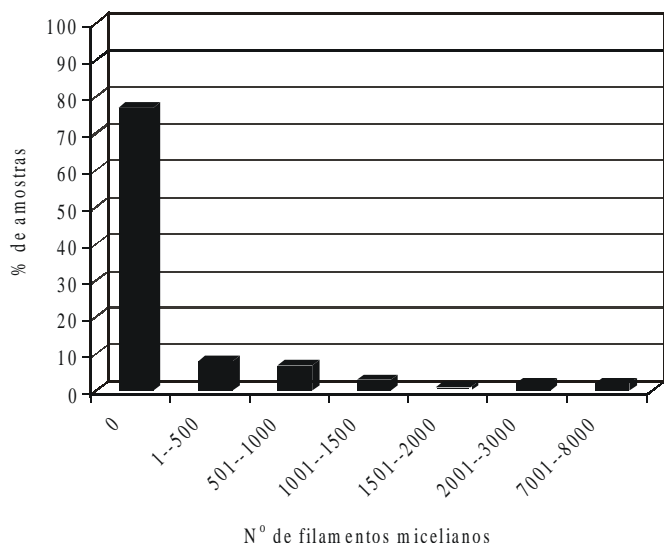
Intervalo de campos positivos	Tipos de geléias de frutas									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
% de amostras										
0	66,7	33,3	16,7	50,0	33,3	55,5	4,2	25,9	16,7	33,6
1—10	33,3	66,7	41,7	50,0	33,3	45,5	12,5	55,5	83,3	11,1
11—20	0,0	0,0	33,3	0,0	33,3	0,0	25,0	14,9	0,0	11,1
21—30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	3,7	0,0	11,1
31—40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4	0,0	0,0	5,5
41—50	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	20,8	0,0	0,0	16,7
51—60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,3	0,0	0,0	5,5
61—70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5
71—80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4	0,0	0,0	0,0
81—90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

A- Abacaxi  
E- Figo  
I- Pêssego

B- Ameixa  
F- Framboesa  
J- Uva

C- Amora  
G- Goiabada

D- Damasco  
H- Morango



**Figura 2.** Percentuais de amostras de geléias de frutas, quanto à contagem de filamentos micelianos de *Geotrichum*.

Estudos com polpas de abacaxi, morango e uva, entre outras, para determinação de bolores e leveduras, utilizando técnicas de contagem em placas e de tubos múltiplos (métodos que avaliam a contaminação por fungos viáveis) apresentaram resultados positivos para esses contaminantes<sup>13</sup>. A utilização dessas polpas de frutas contendo bolores, como matéria-prima para a fabricação de geléias (ou outros doces de frutas), mesmo após o

processamento térmico as hifas dos fungos permanecem no produto final e, embora não sendo viáveis, poderiam ser detectadas na contagem de filamentos micelianos.

### Contagem de *Geotrichum*

Na Figura 2 verifica-se que a maioria das amostras de geléias de frutas (77%) não continha filamentos micelianos de *Geotrichum*, enquanto 23% apresentaram de 1 até 8000 filamentos em 100 mL de preparação.

As geléias de abacaxi, ameixa e figo estavam isentas desse fungo, enquanto as de goiaba e morango apresentaram as maiores contagens de filamentos em termos de valores máximos (Tabela 5).

### CONCLUSÕES

- A padronização da diluição da amostra para o método Howard nos produtos, cujas frutas não tinham diluição estabelecida, permitiu a contagem de filamentos de fungos em geléias dessas frutas.
- As geléias de frutas apresentaram como principal contaminante os filamentos de fungos, determinado pelo método Howard, seguido pelas matérias estranhas em percentual significativo de amostras.
- As matérias estranhas encontradas com maior frequência nas geléias foram insetos, ácaros e fragmentos de insetos.

**Tabela 5.** Números e percentuais de amostras por tipos de geléias de frutas, quanto à contagem de filamentos micelianos de *Geotrichum*.

Intervalo de filamentos micelianos	Tipos de geléias de frutas									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nº	% de amostras									
0	100,0	100,0	83,4	66,6	100,0	77,8	70,7	74,1	83,3	72,3
1—500	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	11,1	4,2	7,4	16,7	16,7
501—1000	0,0	0,0	8,3	16,7	0,0	11,1	12,5	3,7	0,0	5,5
1001—1500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	7,4	0,0	5,5
1501—2000	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2001—3000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	3,7	0,0	0,0
7001—8000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	3,7	0,0	0,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

A- Abacaxi  
E- Figo  
I- Pêssego

B- Ameixa  
F- Framboesa  
J- Uva

C- Amora  
G- Goiabada

D- Damasco  
H- Morango

• As geléias de abacaxi e de ameixa apresentaram menor número de amostras com os contaminantes estudados.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

À Márcia Bittar Atui, Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na identificação dos insetos e ácaros.

RIALA6/938

Correia, M.e Roncada, M.J. Standardization of method and quantification of extraneous materials and mycelial of molds. II. Fruit jams. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 41 - 48, 2003.

**ABSTRACT.** Fruit jams as well as other nourishing products of vegetal origin may present as contaminants extraneous materials and mold mycelial, when inadequate raw material is used or good manufacture practices are not adopted. The objective of the present study was to standardize analytical procedures for quantification of mold mycelials and *Geotrichum* mold, and extraneous materials in fruits jams and to evaluate such contaminants in 117 samples of the products obtained from supermarkets in the city of São Paulo, Brazil. The methods of the Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) were adopted. As result of the standardization, a 1+6 dilution was established for the pineapple, plum, fig and grape jams for the Howard mold counting. According to the results, 56.4% of the samples presented extraneous materials (mainly insects fragments); 73.0% contained mycelial fragments for the Howard mold counting and 23.0% were positive for mycelial fragments of *Geotrichum* mold. The plum and pineapple jams presented the lowest number of samples with the studied contaminants. Considering the current food legislation, the evaluated products presented high index of contamination for mycelial fragments and extraneous materials.

**KEY WORDS.** Fruit jams; microscopic analysis; extraneous materials; molds.

---

#### REFERÊNCIAS

1. AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, U.S.A. Cap. 16. (1 CD-ROM), 2000.
2. Borror, D.J.; Delong, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blucher; 1988.
3. Brasil. Resolução Normativa da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos nº 12 de 23.7.1978. Aprova as seguintes normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, revisadas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas) para efeito em todo o território brasileiro. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. 1, p. 11.499-526.
4. Brasil. Resolução Normativa da Câmara Técnica de Alimentos nº 15 de nov. 1978. Estabelece normas que têm por objetivo fixar a identidade e características mínimas de qualidade a que devem obedecer as geléias de frutas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 01 març. 1979. Seção I, pt. 1, p. 2.929-31.
5. Brasil. Lei nº 8.078 de 11.9.1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 set. 1990. Suplemento ao nº 176, p. 1-12.
6. Brasil. Portaria nº 1.428 de 26.11.1993. Aprova, na forma dos textos anexos, o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, as Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2 dez. 1993. Seção I, p. 18.415-9.
7. Carvalho Neto, C. **Manual prático de biologia e controle de roedores**. São Paulo: CIBA-GEIGY, 1987. 14 p.
8. Gorhan, J.R. (Editor). **Insect and mite pests in food: an illustrated key**. Washington (DC): Department of Agriculture; 1987. (Agriculture Handbook Number 655).
9. Gorhan, J. R. (Editor). **Training manual for analytical entomology in the food industry**. Washington (DC): FDA; 1977. p. 48-52. (FDA Technical Bulletin 2).
10. **Insects of Australia: a textbook for students and research workers**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell Un. Pres.; 1990. v.1.
11. Hugges, A.M. **The mites of stored food and houses**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food; 1976. (Technical Bulletin 9).
12. Krantz, G.W. **A manual of acarology**. 2<sup>nd</sup> ed. Corvallis: Oregon State University, 1978.
13. Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Pagnocca FC, Vinturim TM, Mansor AP. Microrganismos contaminantes de polpa de frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 17: 32-7, 1997 ref. 13.

14. Olsen, A. R. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric disease. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, 28: 199-211, 1998.
15. São Paulo (Estado). Decreto nº 12.486 de 20.10.1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 21 out. 1978, p. 1-42 (NTA 25 e 26).
16. Stasny, J. T.; Albright, F..R.; Graham, R. Identification of foreign matter in foods. **Scanning Electron Microscopy**, 3:599-610, 1981.
17. Taylor, R.B. Introducción al procesado de las frutas. In: Artley, D.; Ashurst, P.R. editores. **Processado de frutas**. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 1-19.
18. Yokoya, F. Método Howard para contagem de fungos em produtos industrializados. Campinas: UNICAMP. 1993.
19. Vasquez, A. W. Hairs. In: Gorhan, J.R., editor. **Principles of food analysis for filth, decomposition, and foreign matter**. Washington (DC): FDA; 1981, p. 125-70. (FDA Technical Bulletin 2).

Recebido em 18/11/2002; Aprovado em 06/02/2003

## 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

Mônica R. MAZALLI<sup>1</sup>  
Tatiana SALDANHA<sup>1</sup>  
Neura BRAGAGNOLO<sup>2\*</sup>

RIALA6/939

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.

**RESUMO.** Os métodos enzimáticos apesar de serem baratos e simples são pouco utilizados na análise de colesterol em alimentos, uma vez que a enzima reage com qualquer esteroide presente na amostra. Considerando que ovos possuem apenas colesterol, o objetivo deste trabalho foi otimizar um método enzimático para determinação de colesterol em gema de ovos e compará-lo com um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em ambos os métodos foi realizada saponificação direta das amostras e extração da matéria insaponificável com hexano. No método enzimático foi utilizado um *kit* (LABORLAB SA) e a absorbância foi determinada a 499 nm, 90 minutos após a reação. Na CLAE utilizou-se coluna C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm x 4 µm (Chromolith, Merck), fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15) e fluxo de 2 mL/min. Os métodos foram validados através de testes de recuperação, material de referência certificado de ovo em pó (SRM 1846, NIST) e repetibilidade. Os valores médios de colesterol nos ovos foram 1363 ± 47 e 1364 ± 40 mg/100g de gema para o método enzimático e por CLAE, respectivamente, não havendo diferenças significativas (p>0,01) entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Ambos os métodos podem ser utilizados com confiabilidade para determinação de colesterol em gema de ovos, sendo que o método enzimático possui a vantagem de ser bem menos oneroso que o por CLAE.

**PALAVRAS-CHAVE.** colesterol, CLAE, método enzimático, ovos.

<sup>1</sup> alunas de pós-graduação em Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

\* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, C.P. 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, email: neura@fea.unicamp.br.



## INTRODUÇÃO

O total de colesterol nos ovos tem correlação positiva com a linhagem e idade das aves, peso do ovo, peso da gema e correlação negativa com o percentual de produção e níveis protéicos da dieta<sup>2,13</sup>. Deste modo, os valores encontrados na literatura para colesterol em ovos variam largamente. Estas diferenças também são geradas, devido a grande variedade de métodos analíticos.

Para obtenção de resultados analíticos confiáveis, torna-se necessário a validação dos métodos analíticos escolhidos, que podem ser validados no próprio laboratório através de teste de recuperação e pelo emprego de material de referência certificado. Somente desta forma, os resultados encontrados terão exatidão e precisão adequadas para a finalidade a que se destinam<sup>12</sup>.

O método colorimétrico foi muito utilizado para determinação de colesterol em alimentos, entretanto, superestimam o teor de colesterol, devido principalmente, a presença de fitoesteróis, de triacilgliceróis ou ácidos graxos livres, que interferem na formação da cor<sup>3,7,10</sup>. Por outro lado, segundo Bragagnolo e Rodriguez-Amaya<sup>5,6</sup>, dependendo do método colorimétrico pode-se obter resultados comparáveis aos métodos cromatográficos.

Atualmente, os métodos cromatográficos são os mais empregados, porém, apresentam custos elevados. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido bastante utilizada na determinação do colesterol em alimentos, pois além de separar os esteróis, também separam outros possíveis interferentes e ainda pode ser realizada a temperatura ambiente, ao contrário da cromatografia gasosa (CG), impedindo deste modo, a oxidação do colesterol<sup>5</sup>.

Apesar dos métodos enzimáticos serem mais baratos e simples, não existem muitos estudos à respeito de sua utilização em alimentos, pois estes não apresentam especificidade para o colesterol, mas também para qualquer outro esterol presente, podendo desde modo, superestimarem os resultados<sup>1,7,10</sup>. Baseiam-se na degradação do colesterol pela enzima colesterol-oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que através de reação secundária produzem cor. No entanto, Jiang et al.<sup>7</sup> não encontraram diferenças significativas nos valores de colesterol em ovos obtidos através dos métodos enzimático, CLAE e CG.

Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar um método enzimático para determinação de colesterol em ovos e compará-lo com um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostras

Para a realização deste trabalho foram adquiridos, ao

acaso, ovos com peso médio de 60 g e peso médio de gema de 17 g, obtidos em diferentes supermercados de Campinas, São Paulo.

Os ovos foram cozidos por cinco minutos após ebulição e posteriormente as gemas foram separadas, misturadas e homogenizadas, tomando-se 15 alíquotas de 0,25 g para análise.

### 2. Método

Em ambos os métodos as etapas anteriores a quantificação foram semelhantes, realizando-se saponificação direta das amostras e extração da matéria insaponificável segundo Bragagnolo e Rodriguez-Amaya<sup>4</sup>, com modificações realizadas durante o presente trabalho. A Figura 1 demonstra o fluxograma analítico.

#### 2.1 Saponificação direta

Pesou-se 0,25 g de amostra em tubo de ensaio com tampa rosqueável de 70 mL e adicionou-se 10 mL de KOH 2% em etanol absoluto. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria à 50°C em agitação por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 5 mL de água destilada e deixou-se resfriar. Para extração da matéria insaponificável, adicionou-se 10 mL de hexano agitando em vortex por um minuto. Após a separação, toda a fase hexânica foi transferida para um tubo com tampa rosqueável de 50 mL. Repetiu-se a extração mais duas vezes.

#### 2.2. Determinação do colesterol pelo método enzimático

Para o método enzimático foi utilizado um *kit* (LABORLAB S.A) cuja enzima colesterol-oxidase reage com o grupo 3 β-OH dos esteróis produzindo peróxido de hidrogênio que através de uma reação secundária produz luteína, um composto de coloração rosada. A escolha do *kit* enzimático foi baseada no trabalho de Nogueira e Bragagnolo<sup>10</sup> que verificaram não haver diferenças nos resultados de colesterol obtidos por este *kit*, rotineiramente usado na determinação de colesterol sérico e outro específico para colesterol em alimentos.

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato de hexano foi seco sob N<sub>2</sub>. Em seguida, 0,5 mL de isopropanol grau cromatográfico foi adicionado e agitou-se em vortex. Adicionou-se 3 mL do reativo enzimático preparado da seguinte forma: 0,5 mL do reativo de cor n° 1 (4 aminofenazona 0,025 mol/L), 0,5 mL do reativo de cor n° 2 (fenol 0,055 mol/L), 19 ml de água destilada e 0,4 mL do reativo enzimático (lipase e" 300 U/mL, COD e" 3 U/mL, POD e" 20 U/mL) à amostra. Procedeu-se tratamento térmico por 10 minutos a 37 ± 2°C em banho-maria. Após repouso de 1,5 horas, leu-se a absorbância em espectrofotômetro, contra o branco, igualmente preparado, a 499 nm. A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de colesterol (50 mg/50 mL), variando de 0,04 a 0,24 mg.

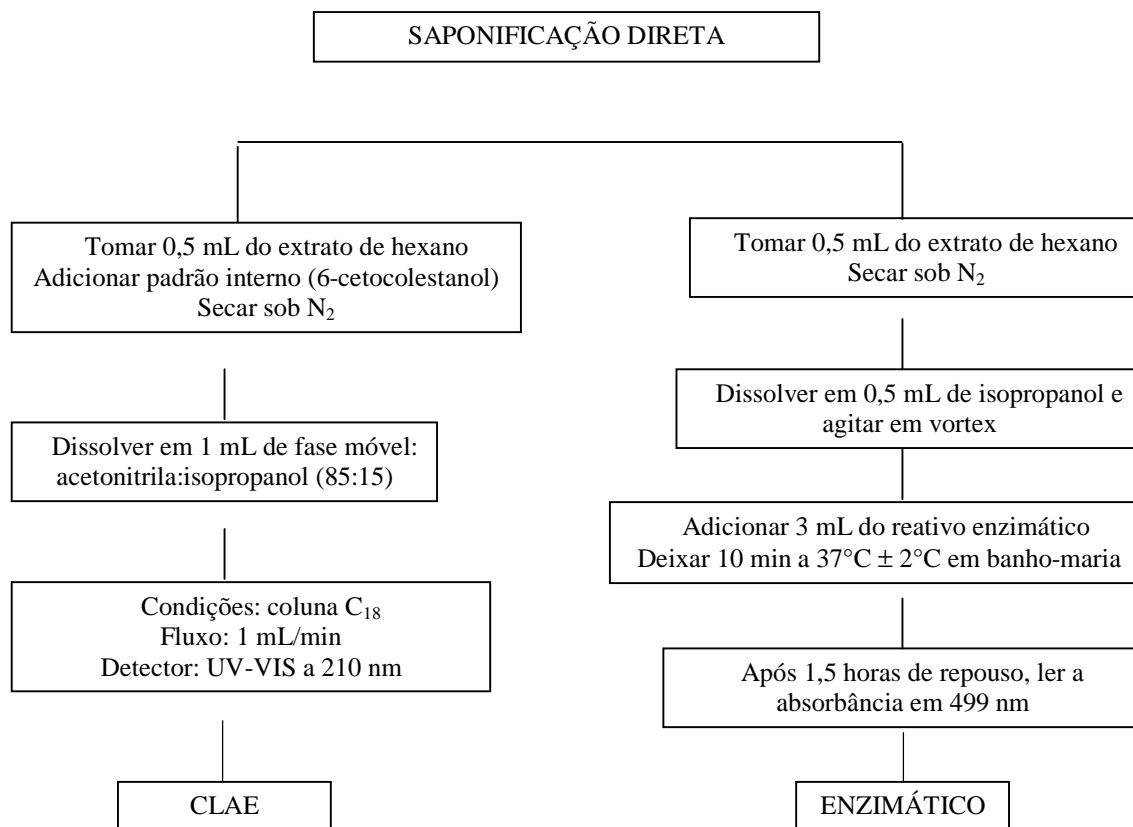


FIGURA 1. Fluxograma para determinação de colesterol por CLAE e pelo método enzimático

### 2.3. Determinação do colesterol por CLAE

Tomou-se 0,5 mL do extrato de hexano, adicionou-se 0,5 mL (0,504 mg) de 6-cetocolesterol como padrão interno e secou-se sob  $N_2$ . Em seguida, foi dissolvido em 1 mL de fase móvel, filtrado em membrana com poro de 0,45  $\mu m$ . Injetou-se no cromatógrafo líquido (SHIMADZU), constituído por um sistema de solventes (LAD 10); válvula “Rheodyne” com alça de amostragem de 20  $\mu L$  e detector UV-VIS (SPD-10 AV). A coluna analítica usada foi  $C_{18}$ , 100 mm x 4,6 mm x 4  $\mu m$  (Chromolith, Merck). A fase móvel utilizada foi acetoneitrila:isopropanol (85:15), com fluxo de 2 mL/min. Os solventes utilizados foram grau cromatográfico, filtrados e degaseificados em ultra-som antes do uso. Os cromatogramas foram processados a 210 nm.

A identificação do colesterol foi realizada através da comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão e a quantificação por padronização interna, utilizando 6-cetocolesterol como padrão interno. Um cromatograma característico pode ser observado na Figura 2.

### 3. Validação dos métodos analíticos

Os métodos foram validados intralaboratorialmente através do emprego de material de referência certificado de ovo

em pó (SRM 1846, NIST), teste de recuperação adicionando-se dois níveis (0,79 e 1,56 mg/100g) de colesterol à amostra e repetibilidade através do coeficiente de variação.

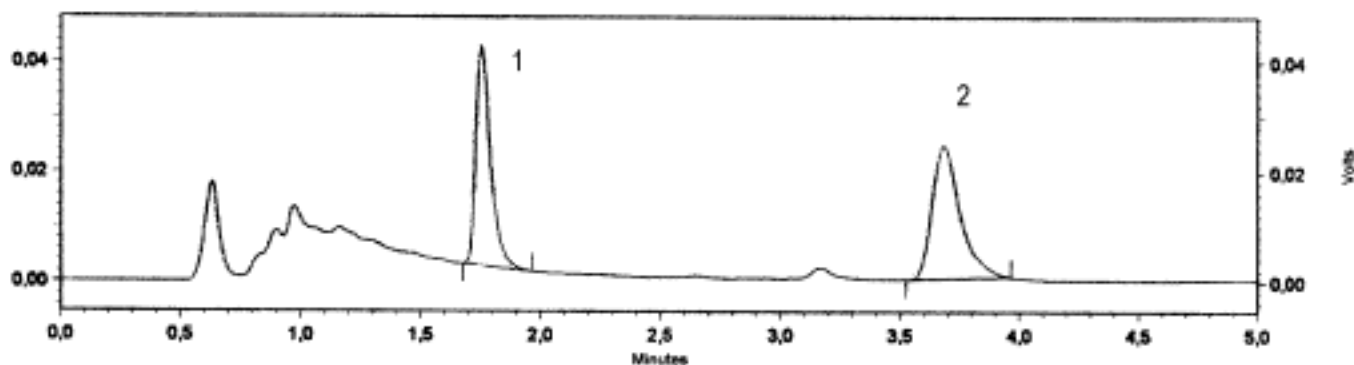
### 4. Análise estatística

Para verificar as diferenças entre os dados de colesterol obtidos pelos dois métodos e a comparação dos valores experimentais com o padrão de referência certificado (SEM 1846, NIST) foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de material de referência certificado (Tabela 1) de ovo em pó (SRM 1846, NIST) foram  $19,1 \pm 0,2$  mg/g para CLAE e  $18,8 \pm 0,3$  mg/g pelo enzimático, os quais não foram significativamente diferentes do valor referido no material de referência certificado ( $19 \pm 0,2$  mg de colesterol/g de gema).

Ambos os métodos apresentaram uma boa recuperação (Tabela 2), embora o método por CLAE apresentou valores mais elevados (99 e 96%) do que o método enzimático (93 e 92%). Valores superiores de recuperação foram encontrados por Shen et al.<sup>11</sup> em gema de ovos (97,6%) e por Karkalas et al.<sup>8</sup>



**Figura 2.** Cromatograma característico de amostra de gema de ovo obtido por CLAE. **Condições cromatográficas:** Fase móvel: acetonitrila:isopropanol (85:15), coluna C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm x 4 µm (Chromolith, Merck.), fluxo de 2 mL/min. Picos: (1) 6-cetocolesterol e (2) colesterol.

em carne e queijo (99,2%), ambos utilizando métodos enzimáticos. No trabalho de Bragagnolo e Rodriguez-Amaya<sup>4</sup>, foram encontrados resultados semelhantes de recuperação ao do presente estudo, obtidos por CLAE, na determinação de colesterol em ovos.

Os coeficientes de variação (% CV) entre as amostras (Tabela 3) nos métodos foram equivalentes, variando 3,4% para CLAE e 2,9% para o método enzimático, assim como, para os resultados do material de referência certificado (Tabela 1) que variaram 1,3% para CLAE e 1,2% para o método enzimático. A repetibilidade entre os métodos foi satisfatória, embora o método enzimático dependeu de um controle rigoroso nas condições de análise. Os coeficientes de variações obtidos por Shen et al.<sup>11</sup> em gema de ovos (1,6%) e por Nogueira e

Bragagnolo<sup>9</sup> (4,5%) em ovo em pó, foram semelhantes e maiores, respectivamente, ambos utilizando métodos enzimáticos.

Os valores médios de colesterol em gema de ovos foram  $1363 \pm 47$  e  $1364 \pm 40$  mg/100g de gema para o método enzimático e por CLAE, respectivamente, não havendo diferenças significativas ( $p > 0,01$ ) entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Shen et al.<sup>11</sup> também não encontraram diferenças significativas na determinação de colesterol em ovos utilizando o método enzimático e a CG e Jiang et al.<sup>7</sup> utilizando os métodos enzimático, CLAE e CG.

Os valores de colesterol obtidos em ovos no presente trabalho (232 mg/ovo) foram inferiores ao USDA<sup>14</sup> e semelhantes aos encontrados por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya<sup>4</sup>.

**Tabela 1:** Teores de colesterol (mg/g) obtidos pela comparação entre os métodos enzimático e por CLAE em material de referência certificado de ovo em pó (SRM 1846).

	Método CLAE	Método enzimático	SRM 1846
média ± dp	19,1 ± 0,2 a	18,8 ± 0,3 a	19,0 ± 0,2 a
CV (%)	1,3	1,2	1,1

média ± dp = média ± estimativa de desvio padrão de 5 amostras.

CV = coeficiente de variação

Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 1%.

**Tabela 2.** Recuperação de colesterol (%) em amostra de gema de ovo, obtidos pelos métodos por CLAE e enzimático.

Colesterol adicionado (mg/100g de amostra)	Método CLAE		Método enzimático	
	média ± dp	CV (%)	média ± dp	CV (%)
0,79	99,0 ± 1,0	2,0	93,0 ± 2,4	2,6
1,56	96,0 ± 1,0	1,0	92,0 ± 1,0	1,0

média ± dp = média ± estimativa de desvio padrão de 5 amostras.

CV = coeficiente de variação

**Tabela 3:** Resultados de colesterol (mg/100g) em gema de ovo, obtidos pelos métodos por CLAE e enzimático.

Ovos	Método CLAE	Método enzimático
1	1294 a	1341 a
2	1376 a	1318 a
3	1347 a	1329 a
4	1371 a	1324 a
5	1312 a	1347 a
6	1365 a	1359 a
7	1382 a	1353 a
8	1371 a	1424 a
9	1288 a	1406 a
10	1388 a	1394 a
11	1318 a	1312 a
12	1424 a	1424 a
13	1341 a	1329 a
14	1418 a	1406 a
15	1447 a	1394 a
<b>Média ± dp</b>	<b>1363 ± 47</b>	<b>1364 ± 40</b>
<b>CV (%)</b>	<b>3,4</b>	<b>2,9</b>

média ± dp = média ± desvio padrão de 15 amostras.

CV = coeficiente de variação

Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 1%.

### CONCLUSÃO

Ambos os métodos podem ser utilizados com confiabilidade para determinação de colesterol em ovos, sendo que o método enzimático possui a vantagem de ser bem menos oneroso que o por CLAE, porém exige um controle rigoroso nas condições de análise.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAEP (Fundação de Apoio ao Ensino à Pesquisa), UNICAMP e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa), pelo apoio financeiro.

Mazalli, M. R.; Saldanha, T. e Bragagnolo, N. - The determination of cholesterol in eggs: a comparison of an enzymatic method with that of high performance liquid chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 49 - 54 ,2003.

**ABSTRACT.** Enzymatic methods are simple and of low-cost, but are nevertheless little used in the determination of cholesterol in foods as the enzyme reacts with any sterol, present in the sample. As eggs only have cholesterol, the objective of this study was to optimize an enzymatic method for the determination of cholesterol in eggs and compare it to a high performance liquid chromatography (HPLC) method. For both methods, the samples were saponified directly and the unsaponifiable matter extracted with hexane. For the enzymatic method, a test kit (LABORLAB S.A) was used and the absorbance read at 499 nm, 90 minutes after the reaction. For HPLC, a C<sub>18</sub>, 100 x 4.6 mm x 4 µm (Chromolith, Merck) column was used, the solvent being acetonitrile:2-propanol (85:15 v/v) with a flow rate of 2 mL/min. The methods were validated according to recovery test, the use of egg standard reference material (SRM 1846, NIST), and repeatability. The mean result for the enzymatic method was 1363 ± 47 and for HPLC 1364 ± 40 mg/100 g of yolk. There were no significant differences (p>0.01) found between the results of the two methods. Both methods are reliable for use in the determination of cholesterol in yolk, the enzymatic method showing the additional advantage of being cheaper than HPLC.

**KEY WORDS.** cholesterol, eggs, method enzymatic, HPLC.

#### REFERÊNCIAS

1. Amundson, D.M.; Zhou, M. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 38: 43-52, 1999.
2. Beyer, R.S.; Jensen, L. Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. **Poult. Sci.**, 68: 1703-1706, 1989a.
3. Beyer, R.S.; Jensen, L. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **J. Agric. Food Chem.**, 37: 917-920, 1989b.
4. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of the cholesterol content of brazilian chicken and quail eggs. **J. Food Comp. Anal.**, 2003. (no prelo).
5. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 53-57, 2001.
6. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. **Arq. Biol. Tec.**, 36: 237-251, 1993.
7. Jiang, Z.; Fenton, M.; Sim, J.S. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. **Poult. Sci.**, 70: 1015-1019, 1991.
8. Karkalas, J.; Donald, A.E.; Clegg, K.M. Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymic and gas-liquid chromatography methods. **J. Food Technol.**, 17: 281-283, 1981.
9. Nogueira, G.C.; Bragagnolo, N. Utilização de um método enzimático para determinação de colesterol em ovo em pó. **Anais XVI Cong. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 1: 431-434, 1998.
10. Nogueira, G.C.; Bragagnolo, N. Assessment of methodology for the enzymatic assay of cholesterol in egg noodles. **Food Chem.**, 79: 267-270, 2002.
11. Shen, C-S. J.; Chen, I.S.; Sheppard, A.J. Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. **J. Assoc. Anal. Chem.**, 65(5): 1222-1227, 1982.
12. Soares, L. M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1): 79-84, 2001.
13. Stadelman, W.J.; Pratt, D.E. Factors influencing composition of the hen egg. **World's. Poult. Sci. J.**, 45: 247-260, 1989.
14. United State Departamente of Agriculture – USDA. Nutrient database for standart reference. Realease 13. **NDB** 01123, 1999.

Recebido em 25/11/2002 ; Aprovado em 26/03/2003

## Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas

*Eugenia uniflora* L. “ brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties

Mariangela T. AURICCHIO<sup>1\*</sup>  
Elfried. M. BACCHI<sup>2</sup>

RIALA6/940

Auricchio, M. T., e Bacchi, E. M. – Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 55 - 61 ,2003.

**RESUMO.** Estudos realizados com folhas de *Eugenia uniflora* L., foram compilados de modo a registrar o nível de conhecimento disponível sobre a espécie, sua caracterização farmacobotânica, incluindo a comparação e diferenciação histológica entre as várias espécies do gênero, possibilitando a diagnose das espécies da região sul da América do Sul. Os primeiros estudos sobre esta planta se concentraram na elucidação da composição do óleo essencial e sua ação antimicrobiana, na variação da composição do óleo em função de diferentes fatores e comportamento da atividade antimicrobiana exibida neste contexto de variação.

A atividade farmacológica assinalada referiu-se a aspectos da toxicidade aguda, ação inibitória frente à xantina oxidase, efeito antiinflamatório, diminuição da propulsão intestinal e diminuição dos níveis da pressão sanguínea. Contudo os mais recentes achados indicando a inibição das enzimas  $\alpha$  - glicosidase, maltase e sucrase, revelaram possível potencial de emprego no tratamento de diabetes e justifica ainda mais o interesse pelo uso de folhas de *Eugenia uniflora* L.

**PALAVRAS-CHAVES.** *Eugenia uniflora* L., atividade farmacológica, farmacobotânica, óleo essencial , revisão.

### INTRODUÇÃO

“Nada é mais imaturo na ciência do que a crença que nada pode ser aprendido do passado”, dizia o prof. V. E. Tyler<sup>1</sup> em seu artigo “Phytomedicines: Back to the Future” (1999). Examinado-se o passado, vê-se que a história do desenvolvimento dos fármacos ocorreu em etapas: no começo os materiais vegetais eram usados como encontrados no meio ambiente; depois, estes passaram a ser concentrados para melhorar a intensidade e uniformidade de sua ação. Na

seqüência, à medida que os progressos da química se impunham, as substâncias ativas puderam ser isoladas e, finalmente, usadas como protótipos de moléculas sinteticamente elaboradas, as quais possuíam atividade ainda maior. Apesar do aumento na síntese de novos medicamentos, com crescimento do arsenal terapêutico disponível, estudos indicam que pelo menos um terço dos pacientes tratados pela medicina convencional nos Estados Unidos faz uso da fitoterapia, segundo avalia o NIH (National Institute of Health), (Fetrow & Ávila<sup>11</sup>, 1999) ainda que muitos deles deixem de revelar isso aos médicos. De fato já em 1990 a

<sup>1</sup>Serviço de Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz

<sup>2</sup>Profa Dra Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

indústria de fitoterápicos vendeu em sete países da comunidade europeia, 2,4 bilhões de dólares, segundo Newall et al.<sup>27</sup>(1996) Nos Estados Unidos, em 1995, este valor foi de 3,2 bilhões de dólares, com crescimento anual de 25% desde então. Assim, a fitoterapia, que é utilizada pela humanidade há muitos séculos não é um modismo, mas seu uso vem se generalizando em todo mundo, passando a fazer parte da moderna prática médica (Newall et al.<sup>27</sup>1996).

Segundo Fetrow & Ávila<sup>11</sup> (1999) apenas uma pequena porcentagem das espécies vegetais foi adequadamente estudada quanto a sua atividade farmacológica. As plantas medicinais devem ser também consideradas quanto ao risco associado a seu uso, pois várias podem apresentar toxicidade .

É difícil selecionar as espécies vegetais a investigar quanto ao potencial farmacológico, levando-se em conta a imensa quantidade de espécies a explorar. Os relatos da medicina popular costumam ser vistos como eficazes na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas e, orientadores das pesquisas com plantas medicinais.

O estudo da toxicidade de plantas medicinais também tem despertado interesse pois permite que se avalie a segurança de uso do fitoterápico.

A *Eugenia uniflora* L., pertence à família Myrtaceae que apresenta espécies com compostos fenólicos com ação antioxidante e algumas com ação hipoglicemiante e anti-reumáticas, também utilizadas em distúrbios estomacais e como anti-hipertensiva. (Almeida et al.<sup>2</sup>, 1995).

A *Eugenia uniflora* L. ( pitangueira) é uma planta de frutos comestíveis muito conhecida e apreciada no Brasil, e o chá de suas folhas tem aplicação na medicina popular principalmente como hipotensor, antigota, estomáquico e hipoglicemiante. Esta revisão traz as informações disponíveis até o presente sobre a farmacobotânica, química e farmacologia desta espécie, como contribuição ao conhecimento e potencial de nossas plantas medicinais.

### Gênero *Eugenia*

*Eugenia uniflora* L. pertence à família Myrtaceae, composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies de arbustos e árvores verdes durante todo o ano e cujas folhas opostas, com nervuras marginais são freqüentes nesta família, bem representada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas. Myrtaceae está dividida em duas subfamílias: Myrtoideae, apresentando frequentemente frutos em bagas, inclui os gêneros *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Pseudocaryophyllus* e *Syzygium*, e Leptospermoideae, com frutos na sua maioria com semente única do tipo noz, à qual pertencem os gêneros *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Malaleuca* (Tyler<sup>40</sup>,1996).

*Psidium guajava* L. é uma das espécies mais estudadas desta família. Seshadri & Vasishtha<sup>37</sup> (1965), fracionando o extrato etanólico das folhas frescas desta planta medicinal, isolaram a

quercetina e seu derivado 3 – arabino - piranósido (guaijaverina) e um glicósido do ácido elágico ( 4 – gentiobiósido), este semelhante a amritósido, anteriormente isolado do caule desta planta. Okuda et al.<sup>29</sup>(1987) isolaram três taninos hidrolisáveis, da porção solúvel do extrato de acetato de etila bruto, denominados guavinas A, C e D.

Lutterodt & Maleque<sup>21</sup> (1988) relataram efeito supressor da atividade locomotora em camundongos, tanto pela administração oral como intraperitonial, de extrato metanólico de folhas de *P. guajava*. Lutterodt<sup>20</sup> (1992) estudou o efeito de extrato hidroalcoólico, e da quercetina , extraídos de folhas de *P. guajava*, em preparações de óleo de cobaia , tendo demonstrado atividade da quercetina em concentrações a partir de 1,6µg/mL. Olajide et al.<sup>30</sup>(1999) mostraram que o extrato metanólico de folhas de *P. guajava* inibiu edema induzido por carragenina em patas de ratos e por ácido acético em patas de camundongos além de exibir atividade antipirética. A administração oral do extrato também reduziu o tempo de trânsito intestinal e evitou a diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

O gênero *Eugenia*, da subtribo Eugeniinae, ordem Myrtales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida, é um dos maiores da família Myrtaceae, que se distribui em área que vai do México à Argentina (Cronquist<sup>9</sup>,1981). Kawasaki<sup>15</sup>, (1984) apontou, em levantamento taxonômico de espécies na região da Serra do Cipó em Minas Gerais, 11 gêneros e 50 espécies de Myrtaceae, para os quais a autora apresenta chaves de identificação, descrição e ilustrações, Neste estudo seis espécies de *Eugenia* foram relatadas. Na América tropical e subtropical contudo, são referidas mais de 500 espécies deste gênero que consiste de árvores ou arbustos, com flores tetrâmeras ou pentâmeras, solitárias ou em racemos, com sépalas bem diferenciadas no botão floral freqüentemente reduzidos a glomérulos ou fascículos, cálice aberto ou fechado, rompendo-se irregularmente, bractéolas persistentes ou decíduas, ovário bilocular com uma ou duas sementes, geralmente membranáceas e embrião com cotilédones unidos. O fruto é uma baga de até três centímetros de diâmetro, esférico e achatado nas extremidades, em gomos mais ou menos salientes, coroados pelo cálice (Braga<sup>6</sup>, 1985).

Nonaka et al.<sup>28</sup> (1987) isolaram os taninos castalagina e vescalagina, de folhas de *Eugenia grandis*, espécie de ocorrência na Ásia. Bello et al.<sup>5</sup>, (1995), estudaram a espécie *Eugenia banderensis* Urb., que cresce no oeste de Cuba e apresenta teor de óleo essencial de 0,01%, no qual foram identificados dezoito componentes, sendo o T – muurolol o principal composto, na porcentagem de 22,09%.

Dellacassa et al.<sup>10</sup> (1997) estudaram a composição do óleo de folhas de *Eugenia uruguayensis* Camb. var. *uruguayensis*, espécie colhida próximo à costa Atlântica no Uruguai, também encontrada no Brasil, Argentina e Paraguai; de seu óleo essencial foram isolados principalmente limoneno (17,6%); 1,8-cineol (17,0%); α-pineno (10,0%) e óxido-cariofileno (3%).

Infusos e decoctos de folhas frescas de *Eugenia jambolana*, espécie empregada na medicina popular como anti-diabética, foram preparados segundo costume de uso popular e administrados a ratos Wistar por Pepato et al.<sup>32</sup>(2001), no modelo estudado, contudo, os autores não obtiveram diferenças estatisticamente significativas nos níveis glicêmicos do grupo tratado e o grupo controle, não demonstrado assim, evidências científicas da ação anti-diabética.

Em estudos fitoquímicos realizados por Lunardi et al.<sup>19</sup> (2001), foram isolados, ácido 6 $\alpha$  - hidroxibetulínico, ácido platânico, ácido betulínico e sitosterol de folhas e caules de *Eugenia moraviana*. O ácido platânico e o ácido betulínico têm despertado interesse pela atividade biológica potencial demonstrada como antitumoral, anti-HIV, antimalária e anti-inflamatória exibida.

### ***Eugenia uniflora* L.**

#### **1. Farmacobotânica de *Eugenia uniflora* L.**

A primeira citação da espécie no Index Kewensis<sup>13</sup> surge em 1893, com o nome de *Stenocalyx pitanga* Berg., a denominação atual só vai constar no mesmo índice em 1985, embora a denominação *Eugenia uniflora* já conste em Angely<sup>3</sup>(1965).

No Brasil a *Eugenia uniflora* pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Angely<sup>3</sup>, 1965). Schmeda-Hirschmann<sup>36</sup> et al.(1987) registram a denominação “Ñangapiri” na Argentina e Paraguai. Weyerstahl et al.<sup>41</sup>(1988), mencionam as denominações populares Ibitanga, Pitangatuba e Pitanga, para os frutos de *Eugenia uniflora* L. no Brasil, e “Brazil Cherry”, “Surinam Cherry” na América de língua inglesa.

As folhas de *E. uniflora* coletadas na cidade de São Paulo, foram caracterizadas farmacognosticamente por Jorge et al.<sup>14</sup> (1994). Segundo os autores, apresentam como características macroscópicas de diagnose, folhas de contorno ovado-oblongo, ápice acuminado, margem foliar lisa e limbo com face ventral um tanto brilhante, o sistema de nervação é penínervo, as nervuras secundárias, quase opostas anastomosam-se junto à margem. A lâmina foliar das folhas adultas é glabra, as folhas são simples, providas de pontos translúcidos, que são observados contra fonte luminosa. O limbo mede de 2 a 7,5 cm de comprimento por 1 a 3,5 cm de largura, folhas são sub-sésseis, com os pecíolos medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Em relação aos detalhes da estrutura microscópica, os autores evidenciaram a epiderme formada por células de contorno variável na forma e no tamanho, cutícula lisa e uniforme. As folhas são hipostomáticas, estômatos paracíticos, raros tricomas tectores simples, glândulas subepidérmicas, mesófilo dorsiventral, cristais prismáticos. A nervura mediana de contorno côncavo-convexo, que é envolvida por bainha fibrosa, faixas colenquimáticas estreitas podem ser observadas sob a região epidérmica da nervura mediana. O

parênquima fundamental é bem desenvolvido; nesta região podem ser observadas drusas. O feixe vascular do tipo bicolateral é envolvido por bainha fibrosa, constituída de duas a cinco camadas celulares, podendo ser interrompidas nas regiões laterais relacionadas com o floema, voltado para epiderme superior.

Lorca et al.<sup>18</sup> (1995), estudando a morfologia e anatomia comparadas de *Eugenia uniflora* L., *Eugenia pyriformis* Camb. e *Hexachlamys edulis* (Berg) Kausel et Legrand, espécies da família Myrtaceae colhidas na região de Misiones (Argentina), determinaram os parâmetros diagnósticos para a identificação destas espécies, assinalando as características microscópicas de *E. uniflora*, comparativamente à outras Myrtaceae. Quanto à epiderme abaxial em *E. uniflora* as células são de contorno sinuoso, estômatos paracíticos. Cortes transversais mostram os estômatos no mesmo nível que as demais células epidérmicas, com grande cavidade subestomática, enquanto em *E. pyriformis*, as células também têm contorno sinuoso, porém são menores que as células da face adaxial e a cutícula é estriada, os estômatos paracíticos se arranjam formando pequenos agrupamentos. Em cortes transversais evidenciam-se os estômatos em posição acima das demais células da epiderme. Glândulas esquisógenas exclusivamente subepidérmicas, dispostas tanto sob a face adaxial como abaxial, cristais quadrangulares ou poliédricos associados ao parênquima também são referidos para *E. uniflora*. A nervura mediana apresenta sistema vascular de formato arqueado, rodeado por uma bainha fibrosa esclerenquimática, floema em disposição adaxial e abaxial com relação ao xilema, abundantes drusas no floema e camada fina de colênquima sob as epidermes adaxial e abaxial. Para *E. pyriformis*, os autores relatam a presença de glândulas esquisolisígenas, sob as duas epidermes e na nervura mediana bainha de fibras esclerenquimáticas ininterrupta envolvendo o sistema vascular também de formato arqueado.

Cortadi et al.<sup>8</sup> (1996) também realizaram estudos de diagnose comparativa entre *E. uniflora* e outras espécies de outros gêneros de Myrtaceae, colhidos na província de Santa Fé (Argentina) baseados nas suas características histológicas. Estes autores apontam estômatos anomocíticos onde as células companheiras são rodeadas por quatro a seis células subsidiárias, dispostas irregularmente e só presentes na epiderme abaxial.

Em relação ao corte transversal das folhas, os autores assinalam a presença de epiderme uniestratificada e cutícula fina, mesófilo dorsiventral, o parênquima paliádico constituído por células grandes apresentando drusas, enquanto o parênquima esponjoso apresenta cavidades esquisolisígenas com diâmetro de 60 $\mu$ m. A nervura mediana mostra sistema vascular constituído por feixes bicolaterais que são acompanhados por uma fina camada de esclerenquima. Uma camada estreita de colênquima contendo drusas dispõe-se sob as duas epidermes.

A anatomia do lenho e da casca de *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia cerasiflora* Miq. é descrita por Soffiati e Angyalossy-Alfonso<sup>38</sup> (1999). Os autores mostram que a anatomia da casca aliada à do lenho é importante para a identificação de espécies



e que, a anatomia da casca exibe diferenças mais evidentes, enquanto o lenho é relativamente uniforme. As espécies diferenciam-se em relação lenho quanto ao tipo de parênquima axial e presença de cristais. Quanto à casca, dentre as características que individualizam as espécies, estão o tipo e o arranjo das células esclerificadas no floema, tipo de periderme e presença de ritidoma.

## 2. Química de *Eugenia uniflora* L.

Em 1977, Rücker et al.<sup>33</sup> isolaram vários componentes do óleo essencial de frutos de *E. uniflora* [sin. *Stenocalyx michelii*], principalmente sesquiterpenos, como furanoelemento, germacreno,  $\gamma$ -elemento, selina-4(14),7(11)-dieno.

Wyerstahl et al.<sup>41</sup> (1988) confirmam estes dados, detalhando a composição do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, obtido com rendimento de 1% como um óleo amarelo, proveniente da Nigéria, do qual cariofileno (5,7%), furanodieno (24%), germacreno B (5,8%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17%) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (14%) são os componentes mais abundantes. Moraes et al.<sup>26</sup> (1996) isolaram e identificaram os componentes do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* L., colhidas na região Nordeste do Brasil, com rendimento de 0,74%, do qual os componentes majoritários são selina-1,3,5(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona, com teores de 48,52% e 17,33% respectivamente.

A incidência dos flavonóides quercetina e miricetina é assinalada por Schmeda-Hirschmann<sup>35</sup> (1995), em folhas de *Eugenia uniflora* coletadas no leste do Paraguai.

Lee et al.<sup>16</sup> (1997), investigando os constituintes fenólicos de folhas de *E. uniflora*, relatam a presença de eugeniflorina D1 (C<sub>75</sub>H<sub>52</sub>O<sub>48</sub>) e eugeniflorina D2 (C<sub>68</sub>H<sub>48</sub>O<sub>45</sub>), dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico das folhas.

Oliveira<sup>31</sup> (1999) verificou a presença de alcalóides por cromatografia em camada delgada em extratos de *Eugenia uniflora*, empregando reativo de Dragendorff para revelação.

Maia et al.<sup>23</sup> (1999) estudaram o óleo essencial de folhas e ramos de *E. uniflora*, colhidos na cidade de Belém, no Pará, tendo sido obtido 1,8% em óleo essencial, do qual germacreno (32,8%), germacreno B (15,6%) e curzereno (30,0%) foram isolados como componentes mais abundantes.

Momose<sup>25</sup> (2000) isolou de *Eugenia uniflora*, as substâncias (-) - (1S,2R,6S,7R,8R,8aR)- 1,2,6,7,8-pentaidroxindolizidina, (+) -(1S,2R,5R,7R,6S,8aS)- 1,2,5,7,8-pentaidroxindolizidina e (+)-(3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-1- metilpiperidina-3,4,5- triol .

## 3. Farmacologia de *Eugenia uniflora* L.

Schmeda-Hirschmann et al.<sup>36</sup>(1987), estudando também a toxicidade do extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* não verificaram toxicidade, em doses até 4,2 g/kg, administradas em camundongos, por via oral. A DL<sub>50</sub> por via intraperitoneal, foi de 220 mg/kg, em camundongos.

Auricchio e Bacchi,<sup>4</sup> (2001) em estudos de toxicidade oral aguda em camundongos da linhagem SWISS, empregando extratos hidroalcoólicos 70% de folhas de *Eugenia uniflora* L., obtiveram DL<sub>50</sub> de 5,93 g/kg de peso do animal, quanto à atividade antimicrobiana o extrato apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 100 g/mL contra *Staphylococcus aureus*.

Theoduloz et al.<sup>39</sup> (1988), avaliando espécies de Myrtaceae paraguaias quanto à IC50, inibição de 50% da atividade da enzima xantina oxidase, obtiveram índices de 22 $\mu$ g/mL, para extrato de folhas de *E. uniflora*. Os índices obtidos para outras espécies da família, variaram de 3 a 50  $\mu$ g/ mL. A ação inibitória dos padrões dos flavonóides quercitrina e miricitrina (miricetina-3-O-ramnósido), sobre a enzima xantina oxidase foi demonstrada.

Schapoval et al.<sup>34</sup> (1994), estudando infusos e decoctos de folhas de *E. uniflora*, seguindo o modo de preparo preconizado pela população, relatam efeito antiinflamatório com a infusão elaborada a partir de folhas frescas; os infusos e decoctos testados mostraram ação analgésica, nas condições do ensaio. A infusão provocou aumento no tempo de sono, induzido por pentobarbital, segundo os autores, provavelmente, devido aos monoterpenos, por atuarem no citocromo P450, o qual está envolvido na biotransformação do pentobarbital. Os decoctos se revelaram mais ativos em relação à diminuição do trânsito intestinal, provavelmente, por extraírem os taninos mais eficazmente. Tanto infusos como os decoctos preparados nas concentrações de 5% (p/v) não exibiram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10321).

Schmeda-Hirschmann<sup>35</sup> (1995), menciona a presença de quercetina e miricitrina ( miricetina-3-O-ramnósido) em folhas de *Eugenia uniflora*

Após a administração de 3mL de uma infusão de 16,67 g de folhas secas à temperatura ambiente em um litro de água, preparados como empregados na medicina popular, Almeida et al.<sup>2</sup> (1995) constataram a diminuição da propulsão intestinal em ratos da linhagem Wistar, machos, adultos como consequência do aumento da densidade das fezes, causado pelo aumento de absorção de água em todas as porções do intestino com exceção do jejuno.

Gbolade et al.<sup>12</sup> (1996) relatam a ação contrátil de extrato de acetato de etila, a partir das folhas de *E. uniflora*, sobre o duodeno isolado de rato, em comparação com acetilcolina. O óleo essencial não exibiu esta atividade, levando os autores a concluir que o extrato contém princípios anticolinérgicos, ausentes no óleo essencial.

Consolini et al.<sup>7</sup> (1999), tendo em conta o uso popular de *Eugenia uniflora* como anti-hipertensiva, estudaram os efeitos da administração intraperitoneal de seu extrato aquoso bruto em ratos normotensos, nos quais observaram decréscimo dose-dependente de até 47,1% nos níveis de pressão sanguínea. Nos estudos que se seguiram, a fim de elucidar o mecanismo desta ação, concluíram os autores que este é mediado pela

vasodilatação direta e uma fraca ação diurética que pode estar relacionada com o aumento do fluxo sanguíneo renal.

Momose<sup>25</sup> (2000) atribuiu atividade inibitória às folhas de *Eugenia uniflora* sobre as enzimas  $\alpha$ -glicosidase, maltase e sucrase, sendo, por isso, útil no tratamento de diabetes. Os extratos obtidos por extração com água quente foram testados por via oral em camundongos e significativa supressão do aumento dos níveis séricos de açúcar foi registrada. Na mesma linha de pesquisa, Matsumura et al.<sup>24</sup> (2000) confirmaram a presença de componentes do extrato aquoso de folhas secas de *E. uniflora* capazes de inibir a degradação enzimática de polissacarídeos a monossacarídeos e determinaram a intensidade da inibição das  $\alpha$ -glicosidases, tendo obtido IC50 de 120 $\mu$ g/mL para maltase e IC50% de 160 $\mu$ g/mL para sucrase. O fracionamento do extrato aquoso por coluna de troca iônica levou à fração que exibiu atividade inibitória para estas enzimas, 13 ou 19 vezes maiores às anteriores. As atividades inibitórias assim obtidas foram de 9 $\mu$ g/mL para a maltase e de 8,5 $\mu$ g/mL para a sucrase. Do fracionamento subsequente os autores chegaram a um composto ainda mais ativo frente à inibição destas enzimas, o qual revelou tratar-se de 1,2,5,7,8-pentaidroxindolizidina, exibindo IC50 de 4  $\mu$ g/mL para maltase e 1,8 $\mu$ g/mL para sucrase.

Auricchio e Bacchi<sup>4</sup>, (2001) em estudos de toxicidade oral aguda em camundongos da linhagem SWISS, empregando extratos hidroalcolólicos de folhas de *Eugenia uniflora* L., obtiveram DL 50% de 5,93 g/kg de peso do animal.

#### 4. Atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L.

Adebajo et al.<sup>1</sup> (1989), tendo por base informações anteriores de que a composição do óleo essencial de frutos e de folhas de *Eugenia uniflora*, varia quali e quantitativamente, dependendo do momento da colheita, estação do ano, estágio de maturidade antes da colheita, estudaram estas variações por meio da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E. uniflora*, colhidos em diferentes estágios de maturação. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi testada pelo método de difusão em placa e os resultados dos diâmetros dos halos de inibição medidos em triplicatas. Os resultados obtidos para *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes* foram diversos para amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em diferentes épocas do ano, indicando uma variação na composição do óleo das diferentes amostras. Comentam os autores que estas diferenças devem ser consideradas na otimização da atividade antimicrobiana da *E. uniflora*. A maioria das amostras foi inativa contra *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*. *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria mais sensível, enquanto *T. menthagrophytes* foi o fungo mais sensível.

Limberger et al.<sup>17</sup> (1998) avaliaram óleos voláteis de folhas frescas de várias espécies pertencentes à família

Myrtaceae, de ocorrência no sul do Brasil, e, dentre elas a *E. uniflora* L. Os resultados obtidos permitiram aos autores concluir que os diferentes óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana em diferentes graus de potência.

#### Discussão e Conclusão

A *Eugenia uniflora* parece ser bem distribuída no território brasileiro, pois parecendo mais abundante a partir do sudeste em direção ao sul, visto ter sido objeto de estudo nos países do sul do nosso continente. Em Minas Gerais, na região da Serra do Cipó, Kawasaki,<sup>15</sup> (1984) relata a existência de poucas espécies do gênero *Eugenia* dentre elas a *Eugenia uniflora* L.

A diferenciação microscópica entre *E. uniflora* e outras espécies parece levar em conta o arranjo dos estômatos e a posição destes em relação às demais células da epiderme. Apesar dos relatos de Jorge et al.<sup>14</sup>, (1994) e de Lorca et al.<sup>18</sup>(1995), Auricchio e Bacchi,<sup>4</sup> (2001) referem estômatos anomocíticos confirmando os achados de Cortadi et al.<sup>8</sup>, (1996). Pode-se observar que vários elementos histológicos são comuns neste gênero, o que pode levar a dificuldades na diagnose quando se dispõe somente do pó das folhas, Soffiati e Angyolossi-Alonso<sup>38</sup>, 1999 indicam a necessidade de verificação da anatomia do lenho e da casca o diagnóstico, porém nas situações de rotina nem sempre isto é possível.

Os óleos essenciais foram os componentes que primeiro despertaram o interesse dos pesquisadores pela composição química desta espécie. Os sesquiterpenos *germacreno* e *selina trienona* são relatados pela primeira vez por Rucker<sup>33</sup> em 1977 e ainda são mencionados em estudos mais recentes.

Os compostos fenólicos foram investigados por vários autores, tendo sido determinados *eugeniflorinas D<sub>1</sub>* e *D<sub>2</sub>*, e mais recentemente, derivados da pentahidroxiindolizidina às quais são atribuídas propriedades que podem demonstrar a ação da *E. uniflora* como antidiabética.

Auricchio e Bacchi,<sup>4</sup> (2001) confirmam a baixa toxicidade oral demonstrada por Schmeda-Hirschmann,<sup>36</sup> (1987) ainda que os autores tenham realizados os experimentos em camundongos de diferentes linhagens.

Theoduloz et al.<sup>39</sup> (1988) demonstra que a atividade do extrato de folhas de *E. uniflora* L. sobre a xantina oxidase estaria num patamar intermediário ao exibido por outras espécies, contudo não permite avaliar se nas condições de utilização esta relação dose-efeito anti-gôta é benéfica para o usuário.

Dos poucos estudos sobre a atividade farmacológica das folhas de *E. uniflora* L. disponíveis, Schapoval et al.<sup>34</sup> (1994) e Almeida et al.<sup>2</sup>(1995) demonstram a ação analgésica e diminuição do trânsito intestinal, nas condições do ensaio, entretanto Gbolade et al.<sup>12</sup>(1996) relata ter observado o aumento a ação contrátil do duodeno, fato que resulta no aumento da propulsão e trânsito intestinais.

Os resultados de Consolini et al.<sup>7</sup> (1999) para avaliação da atividade anti-hipertensiva, não levam em conta a biodisponibilidade dos componentes do extrato, o que limita sua interpretação nas condições de utilização popular, que se dá por via oral e não intraperitoneal como no ensaio. Da mesma forma os achados de Momose et al.<sup>25</sup> (2000) quanto à ação inibitória sobre as enzimas  $\alpha$  - glicosidase, maltase e sucrase estão por ser confirmados nos níveis de dose utilizados na prática de utilização popular.

Embora a maioria dos artigos avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial, deve-se reconhecer que as preparações de uso popular, infusos ou decoctos das folhas, favorecem também a extração dos taninos, os quais apresentam atividade antimicrobiana. Schapoval et al.<sup>34</sup> (1994) não obtiveram atividade antimicrobiana nas

preparações usuais, mostrando que a dose empregada nas preparações populares não seja suficiente para que esta atividade ocorra.

Quando se compara estudos com plantas medicinais, é notória a dificuldade de avaliação entre os resultados, pois as variáveis vão desde os aspectos edáficos - climáticos que exercem influência na composição química, como o estagio do desenvolvimento do vegetal quando da coleta, parte da planta estudada, forma de preparar o material para estudo, até os protocolos seguidos nos experimentos. Mesmo que o potencial de uma planta seja revelado em estudos fitoquímicos prévios, é fundamental repetir essa avaliação no contexto etno-cultural das comunidades, para que sejam evidências seguras e apropriadas para estabelecimento da relação dose-efeito procurado.

RIALA6/940

Auricchio, M. T., e Bacchi, E. M. – *Eugenia uniflora* L. “ brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 55 - 61 ,2003.

**ABSTRACT.** This review intends to gather information available at the present time on *Eugenia uniflora* leaves, pharmacological, antibacterial properties and identification, by comparing histological features to others *Eugenia* species, growing in southern South America allowing differentiation among them. Essential oil composition and antibacterial activity was the first study with *E. uniflora* leaves, in order to evaluate different factors affecting this activity. The exhibited inhibitory action of xantine oxidase, antiinflammatory activity, decrease of intestinal motility and blood pressure level, were demonstrated in animal models. Recent findings on the inhibition of  $\alpha$ - glucosidase, maltase and sucrase are showing to be a new possible potencial use of leaves of *Eugenia uniflora* in diabetes.

**KEY WORDS.** *Eugenia uniflora* L., pharmacological activity, botanical identification, essential oil, review

## REFERÊNCIAS

1. Adebajo, A.C., Olorek, K.J., Aladesanmi, A.J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**,15: 451-455, 1989.
2. Almeida, E.C., Karnikowski, M.G.O., Foleto, R., Baldisserotto, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in pupupal medicine. **Rev. Saúde Pública**, 29:428-433, 1995.
3. Angely, J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: USP, 1965. p.487-491.
4. Auricchio, M. T. – **Estudo Farmacognóstico de folhas de *Eugenia uniflora* L.** São Paulo, 2001.[Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo].
5. Bello, A., Rodriguez, M.L., Castiñeiras, N., Urquiola, A., Rosado, A., Pino, J.A. Major components of the leaf oil of *Eugenia banderensis* Urb. **J. Essent. Oil Res.**, Carol Stream, v.7, p.697-698, 1995.
6. Braga, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 4.ed. Natal: Universitária UFNR, 1985. p.416-417.
7. Consolini, A.E., Baldini, O.A., Amat, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J. Ethnopharmacol.**,66: p.33-39, 1999.
8. Cortadi, A., Di Sapio, M., Gattuso, M. Caracteres anatómicos de tres especies medicinales de la familia Myrtaceae. **Acta Farm. Bonaerense**,15:109-123, 1996.
9. Cronquist, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.13-18.
10. Dellacassa, E., Lorenzo, D., Mondello, L., Cotroneo, A. Uruguayan essential oils. Part VII. Composition of leaf oil of *Eugenia uruguayensis* Camb. var *uruguayensis* (Myrtaceae). **J. Essent. Oil Res.**, 9: 295-297, 1997.
11. Fetrow, C.W., Ávila, J.R. **Manual de medicina alternativa para o profissional** Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1999. 743p.

12. Gbolade, A.A., Ilesanmi, O.R., Aladesanmi, A.J. The contractile effects of the extracts of *Eugenia uniflora* on isolated rat duodenum. **Phytother. Res.**, v:10, p.613-615, 1996.
13. **Index Kewensis Plantarum Phanerogamarum: Supplementarum quartum 1906-1910.** London: Oxford University Press, 1958-
14. Jorge, L.I.F., Oliveira, F., Kato, E.T.M., Oliveira, I. Caracterização farmacognóstica das folhas e dos frutos de *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae. *Lecta*, v.2:103-120, 1994.
15. Kawasaki, M.L. – A Família MYRTACEAE na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil, [Dissertação do Mestrado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p.1984]
16. Lee, M-I., Nishimoto, S., Yang, L-L., Yen, K-Y., Hatano, T., Yoshida, T., Okuda, Y. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry*, 44:1343-1349, 1997.
17. Limberger, R.P., Apel, M.A., Sobral, M., Schapoval, E.S., Henriques, A. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. *Rev. Bras. Farm.*,79:49-52, 1998.
18. Lorca, G.G., Amat, A.G., Gonzáles, C. Analisis comparativo de caracteres diag sticos para la identificacion de tres especies argentinas de Myrtaceae empleadas en la medicina popular. *Acta Farm. Bonaerense*, 14:81-86, 1995.
19. Lunardi, I., Peixoto, J.L.B., Da Silva, C.C., Shuquel, I.T.A., Basso, E.A., Vidotti, G.J. Triterpenic Acidis from *Eugenia moraviana*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12:180-183, 2001.
20. Lutterodt, D.G. Inhibition of microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 37:151-157, 1992.
21. Lutterodt, D.G., Maleque, A. Effects on mice locomotor activity of a narcotic-like principle from *Psidium guajava* leaves. *J. Ethnopharmacol.*, 24:219-231, 1988.
22. Maia, J.G.S., Andrade, M.H.L., Da Silva, M.H.L., Zoghbi, M.G.B. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from north Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, 11:727-729, 1999.
23. Maia, J.G.S., Zoghbi, M.G.B., Luz, A.I.R. Essential oil of *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. *J. Essent. Oil Res.*, 9:337-338, 1997.
24. Matsumura, T., Kasai, M., Hayashi, A., Arisawa, M., Momose, Y., Arai, I., Amagaya, S., Komatsu Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from paraguayan natural medicine, N ngapiry the leaves of *Eugenia uniflora*. *Pharm. Biol.*, 38:302-307, 2000.
25. Momose, Y. Pentahydoryndolizidine and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors containing products of *Eugenia uniflora*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*,72:770, 2000. Apud: *Chem. Abstr.*, 132, abstr. n.203147v, 2000.
26. Morais, S.M., Craveiro, A.A., Machado, M.I.L., Alencar, J.W., Matos, J.A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, 8:449-451, 1996.
27. Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. London: Pharmaceutical Press, 1996. 296p.
28. Nonaka, G-I., Ishimaru, K., Watanabe, M., Nishioka, I., Yamaushi, T., Wan, A.S.C. Tannins and related compounds. II. Elucidation of the stereochemistry of the Triphenol moiety in Castalgin and Vescalagin, and isolation of 1 – O – Galloy – Castalagin from *Eugenia grandis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35:217-220, 1987.
29. Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Yazaki, K., Ikegami, Y., Shingu, T., Guavins A, C and D, complex tannins from *Psidium guajava*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35:443-446, 1987.
30. Olajide, O.A., Awe, S.O., Makinde, J.M. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. *Fitoterapia*, 70:25-31, 1999.
31. Oliveira, A.M. Avalia o química dos alcalóides da espécie *Eugenia uniflora*. In: Encontro Regional De Química, 12, Ribeirão Preto, 1999. Livro de resumos. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Química, 1999. p.65.
32. Pepato, M.T., Folgado, V.B.B., Kettelhut, I.C., Brunetti, I.L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Braz. J. Biol. Res.* 34:389-395, 2001.
33. Rücker, G., Assis Brasil E Silva, G., Bauer, L., Schikarski, M. Neue inhaltsstoffe aus *Stenocalyx Michellii*. *Planta Med.*, 31:305-340, 1977.
34. Schapoval, E.E.S., Silveira, S.M., Alice, C.B., Henriques, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J. Ethnopharmacol.*, 44:137-142, 1994.
35. Schmeda-Hirschmann, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia*, 16:373-374, 1995.
36. Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E., Rojas De Arias, Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 21:183-186, 1987.
37. Seshadri, T.R., Vasishita, K. Polyphenols of the leaves of *Psidium guajava* quercetin, guajaverin, leucocyanidin and amritoside. *Phytochemistry*, 4:989-992, 1965.
38. Soffiatti, P., Angyalossy-Alfonso, V. Estudo anat mico comparativo do lenho e da casca de duas espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Rev. Bras. Bot.*, 22:275-284, 1999.
39. Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E., Schmeda-Hirschmann, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of paraguayan Myrtaceae. *J. Ethnopharmacol.*, 24:179-183, 1988.
40. Tyler, V.E. Phytomedicines: back to the future. *J. Nat. Prod.*, 62:1589-1592, 1999.
41. Wyerstahl, P., Marschall- Wyerstahl, H., Christiansen, C., Oguntimein, B.O., Adeoye, A.O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* L. leaf oil. *Planta Med.*,6:546-549, 1988.

Recebido em 13/11/2002; Aprovado em 15/05/2003



## Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by pollen and physical –chemical analysis.

Cano, C.B. **Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by pollen and physical –chemical analysis.** São Paulo; 2002.[Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP].

Considering the characterization of monofloral honeys as a worldwide tendency, this study presents the development and optimization of methodologies for carbohydrate analysis by HPLC, the kind of standardization for lamina preparations for pollen analysis and the determination of moisture content in order to characterize eucalyptus and citrus monofloral honey samples from some regions in São Paulo State. The modified method of Iwama and Melhem (1979) was employed for pollen analysis pollen cleaning. For lamina preparation it a comparison study was made between the Iwana and Melhem (1979) method and the proposed method (Louveaux modified) through two proportion tests. A comparison for moisture content was made between two official methods (AOAC and EHC) through a factorial desing and a study of variability through hierarchical desings. For the carbohydrate content analysis an optimization of analysis conditions for HPLC was made using mixture desing and a linear regression analysis for calibration curves, a *t-test* for a recovery study and a variance analysis (ANOVA) to compare the carbohydrate contents of both floral origins. In pollen analysis one can observe that the proposed Louveaux modified method was the most adequate since it showed a bigger distribution of less frequently occoring families. With the pollen spectrum (dominant pollen) from honey samples, the monoflorals of eucalyptus and citrus, can be classified. And by complete pollen spectrum analysis one can observe that citrus monofloral honeys contain more diversified families relative to eucalyptus monofloral honeys, suggesting these honeys have a bigger variation of nectars and pollen grains in their formation. This fact can be related to regions of plantation. The factorial desing 2<sup>2</sup> in moisture content suggests that the crystallized samples interfere in refractive index measurements. The (EHC) sample pre-treatment led to lower moisture contents of crystallized

samples. When this pre-treatment was used for liquid samples no significant differences were observed concerning moisture content. Therefore it can be suggested that the EHC refractometric method is more appropriate to use for liquid and crystallized samples. The study of moisture content variability through hierarchical desing and variance analysis indicates significant differences among floral sources and moisture content of honey samples. The use of a aminopropil column of smaller size (15,0 cm x 4,5 cm) and a temperature of 32 °C in the column and 35,5 °C for the refractive index detector and a flow rate of 1.2 ml/min were the best experimental conditions chosen to determine the carbohydrates in honey by HPLC. For the mobile phase the mixture desing indicated that the best combination was 50: 10: 40( acetonitrile, water, ethyl acetate). The calibration curves of the carbohydrates (glucose, fructose, sucrose, turanose, maltose) were linear, with high R<sup>2</sup> and had acceptable accuracy for carbohydrate quantification. Both the detection capacity and quantification capacities were determined the former being (0.2 – 0.4%) and the latter (0.7 – 1.3 %) for sucrose, turanose and maltose. The mean recovery study of carbohydrates suggested that the calibration curves are reliable to determine carbohydrate contents. The evaluation among the mean concentrations of individual carbohydrates by ANOVA and t-test at the 95% confidence level of eucalyptus and citrus monofloral honeys suggested that there are significant differences in glucose, sucrose and turanose concentration in these honey samples. In this way eucalyptus and citrus monofloral honeys can be classified by the pollen spectrum. Therefore, it was concluded that the eucalyptus and citrus monofloral honeys can be classified by moisture content determination and/or carbohydrate (glucose, sucrose and turanose) determination.

Tese disponível nas bibliotecas do Instituto Adolfo Lutz e do Conjunto das Químicas da USP.  
e-mail: [cbonaldi@ial.sp.gov.br](mailto:cbonaldi@ial.sp.gov.br)

## Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by Thermoanalysis

Felsner, M.L.-. **Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by Thermoanalysis.** São Paulo; 2001.[Tese de Doutorado-Instituto de Química- USP].

This work presents the optimization and development of analytical methodologies for evaluation of glass transition temperature ( $T_g$ ) by DSC and for moisture and ash content determinations by TG/DTG of honey samples. Beyond this, a study of variability in these physicochemical parameters determined by conventional methods was realized for eucalyptus and citrus monofloral honeys of some regions of São Paulo State.

For the thermogravimetric evaluation of honey samples, initially a study of thermal behavior of standard of carbohydrates was carried out by TG/DTG, DSC and DTA. The results obtained allowed to distinguish the decomposition steps corresponding to the sugars in relation to other components present in honey. The variabilities in average moisture and ash contents of eucalyptus and citrus monofloral honeys were investigated by a hierarchical design and by an analysis of variance (ANOVA). These physicochemical parameters are significantly different at the 95% confidence level.

For the development and optimization of analytical methodologies for moisture and ash contents in honey by TG/

DTG conventional methods, experimental designs and a F-test for the comparison between variances were utilized. The results suggest that to get average moisture and ash contents in honey by TG/DTG similar to those found by conventional methods an alumine crucible (150  $\mu$ L), heating rates of 5°C/min and microfiber glass paper should be used. Besides this, the comparison between the thermogravimetric method and the conventional ones for these determinations suggest that there are no significant differences between the methods investigated.

For eucalyptus and citrus monofloral honeys average glass transition temperatures of -47 and -55°C, respectively, were determined suggesting a significant difference in this physical property for these honey types. Besides this, a significant negative linear correlation at 95% confidence level ( $r = -0.916$ ) was verified between the moisture contents and glass transition temperatures of these honey types. So, it may be said that the physicochemical parameters, moisture and ash, obtained by conventional and thermogravimetric methods and the glass transition temperature determined by DSC can be utilized for the characterization of the floral origin of these types of honey.

Tese disponível nas bibliotecas do Instituto Adolfo Lutz e do Conjunto das Químicas da USP.  
e-mail: mlfelsner@yahoo.com.br

## Food microscopy of processed fruit products, marketed in the supermarkets of São Paulo, SP

---

Correia, M. **Food microscopy of processed fruit products, marketed in the supermarkets of São Paulo, SP**. São Paulo- SP, 2000. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

---

Food microscopy was used in order to quantify mycelial fragments of mold and extraneous materials in fruit jams, fruit pastes and canned syrup fruits. Official Methods of Analysis (AOAC International, 1995) was applied to Howard mold counting, to *Geotrichum* mold counting and to the determination of extraneous materials in jams, fruit pastes and canned syrup fruits (in this determination of extraneous materials it was used the Macroanalytical Procedures Manual methodology); when necessary, the methods were adapted and/or modified. The modifications made in the adopted methods are commented on. In relation to the hygienic conditions of the sweets which were analyzed through the Howard method, it was checked that the biggest percentage of sample containing mycelial fragments of mold was the fruit pastes, followed by the jams and the canned

syrup fruits. In the *Geotrichum* mold counting, the biggest percentage of positive samples was found in the canned syrup fruits, followed by the fruit pastes, and then, in a smaller percentage, the jams. In relation to extraneous materials, the jams and fruit pastes showed the biggest percentage of positive samples. The fruits showed a different procedure to the same kind of sweet. The methods adopted showed to be appropriate, enabling satisfactory reading of the mold counting as well as of the extraneous materials, making their use possible by food microscopy laboratories. The results which were obtained in the analysis show the need of a revision in the food legislation in force, establishing tolerance limits to the mycelial fragments (except for the *Geotrichum*) and to the insects fragments in the products made of fruit which studied here.

Tese está disponível nas bibliotecas da Faculdade de  
Saúde Pública - USP e do Instituto Adolfo Lutz  
e-mail: [mcorreia@ial.sp.gov.br](mailto:mcorreia@ial.sp.gov.br)



## Pharmacognostic Characterization of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg Myrtaceae

Markman, B. E. O.. Pharmacognostic Characterization of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg Myrtaceae . São Paulo, 2002.[Dissertação de mestrado/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP]

*Campomanesia xanthocarpa* Berg, a species that belongs to the Myrtaceae family, is popularly known as gabiroba. Several therapeutic properties are attributed to the various *Campomanesia* species, such as treating diarrhea, fever, cystitis and urethritis. This project aims at contributing through a chemical and pharmacological study of lyophilized hydrated alcohol extract and the vegetable drug made from leaves. The pharmacological and botanical features of the vegetable drug are indicated in order to help with the diagnosis. Main macroscopic features of the dehydrated leaves include: wavy edges, translucent blade spots, venation type, blade and leafstalk forms and scent. The main anatomical features are: dorsiventral mesophyll; large idoblasts containing prismatic crystal in the palisade parenchyma; predominance of anomocytic stomata in the hypostomatic leaves, globose segregating cavity associated to both surfaces, covered by cells organized in pairs where the commissure wall appears straight, sinuous, or in zigzag; bicollateral vascular bundle and system organized in an open arch, prismatic crystals in the phloem region. Photomicrographs illustrate the study. The phytochemical screening of the vegetable drug and the lyophilized extract

(EHA) indicated the presence of essential oil, flavonoids, tannins and saponins. The essential oil content in the fresh leaves was 0.11%. Linalol (29%) and globulol (20%) were identified as the main oil components. Tannin content was 2.86% in the drug and 8.49% in the EHA extract. The saponin content was 6.27% in the drug and 16% in the EHA extract. The extract displayed a high antioxidant activity in the model of malonyl dialdehyde production measure with  $Q_{1/2} = 0,2891$   $\mu\text{g/mL}$ . In the copper sulfate-induced lipoperoxidation inhibition assay the EHA extract significantly reduced Lag-time and Peak-time for low-density lipoprotein (LDL) oxidability. The EHA extract displayed antiulceration activity in the acute induction model by hydrochloric acid in ethanol, with a 62% protection percentage. The EHA extract displayed antibacterial activity with: CMI  $>1,000$  and  $<500$  mg/mL relative to *Staphylococcus aureus*; CMI  $<500$  and  $>100$  mg/mL for *Salmonella choleraesuis* and CMI  $<1,000$  and  $>500$  mg/mL regarding *Candida albicans*. The EHA extract displayed cytotoxic activity in the *artemias* lethality trial, with  $DL_{50}$  of 0,503 mg/mL. The EHA extract displayed no toxicity in the acute toxicity trial in the 5g/kilo oral dosage per animal body weight.

Tese disponível na biblioteca do Conjunto das  
Químicas e na Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
e-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br

---

## ERRATA VOLUME ANTERIOR

REV. INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 61(2), 2002 - Artigo RIALA6/929

O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *In vitro* com *Salmonella* Rubislaw.

The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *Salmonella* Rubislaw

Pag. 131: no título do resumo em português onde se lê **Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(2)** leia-se **Rev. Inst. Adolfo Lutz, 61(2)**

Pag. 133: no título do resumo em inglês onde se lê **Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(2)** leia-se **Rev. Inst. Adolfo Lutz, 61(2)**

ISSN 0073-9855



9 770073 985009