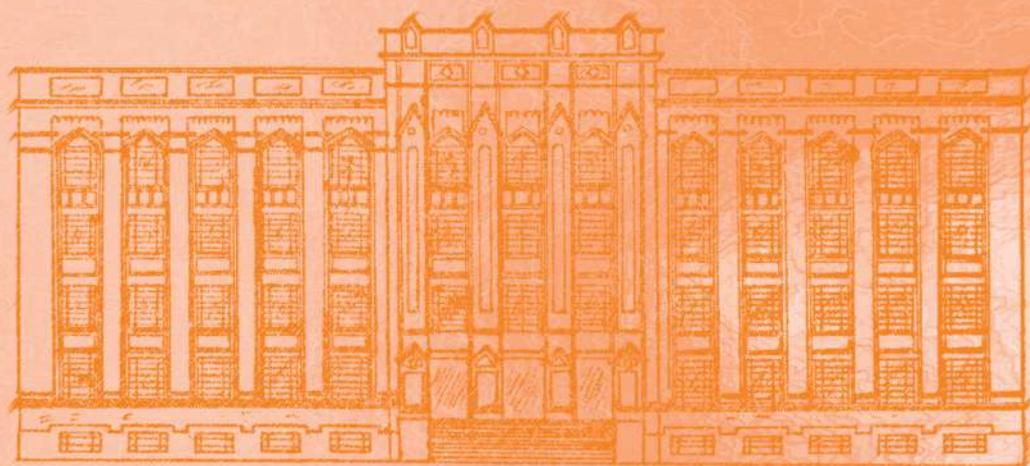


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 61 número 2, 2002



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

PEDRO LUIZ SILVA PINTO - Presidente
MARIA ALICE DA SILVA TELLES - Secretária
CRISTINA ADELAIDE FIGUEIREDO
ELIANI DE ARAÚJO
JANETE ALABURDA
LUZ MARINA TRUJILLO
MARINA YOSHIÊ SAKAMOTO MAEDA
RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS
THAÏS VALÉRIA MILANEZ
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

E-mail: biblioteca@ial.sp.gov.br
riala@ial.sp.gov.br
rial@ial.sp.gov.br

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

Ano 2002

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

1941 - 2002,
2002, 61 (2)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 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

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 confirmação. 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: “Taunay³¹ verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra e: “Pereira e Maia¹⁹, pesquisando...”. para mais de dois autores usar a expressão et al. : “no trabalho de Tsunoda et al.⁶⁹”; ou ainda... “Segundo vários autores^{1,3,7,89}”.

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/forum97/97A30.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

- 920 **Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000.**
Olive oil: adulteration from 1993 to 2000.
Sabria AUED-PIMENTEL, Emy TAKEMOTO, Regina S. MINAZZI-RODRIGUES e Elza S. G. BADOLATO 69-75
- 921 **Enriquecimento proteico de farelo de arroz desengordurado, com sangue bovino, utilizando a técnica de leito de jorro.**
Proteinic improvement of deffated rice bran, with bovine blood, using the spouted bed technique.
André F. MASSARO e Luiz Antonio de A. PINTO 77-84
- 922 **Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. I. doces de frutas em pasta.**
Standardization of method and quantification of the extraneous materials and mycelial of molds. I. Fruit pastes in sweets.
Marlene CORREIA e Maria José RONCADA 85-90
- 923 **Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*.**
Strategies for identification of the *Mycobacterium fortuitum* complex species.
Roberta M. BLANCO, Vânia T. G. INUMARU, Maria Conceição MARTINS, Carmen M.S. GIAMPAGLIA, Suely Y.M. UEKI, Erica CHIMARA, Júlia T.U. YOSHIDA e Maria Alice S. TELLES 91-96
- 924 **Cinética celular em lesões pré-invasivas e invasivas do epitélio escamoso cervical: estudo morfológico e imunoistoquímico.**
Cellular kinetics in preinvasive and invasive lesions of cervical squamous epithelium : morfologic and immunohistochemical study.
Luzia S. U. YAMAMOTO, Marina Y. S. MAEDA, Janaína E. PITTOLI, Evandro S. de MELLO, Luciana de O. LEANDRO, Alda WAKAMATSU e Celso di LORETO 97-101
- 925 **Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e frequência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado**
Sandfly ecological observations in Eldorado County, Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil, an endemic area of American Cutaneous Leishmaniasis. Period between 1996 and 1997. I – Sazonality and frequency of *Lutzomyia ayrozai* to different ecotopes with-sentinels animals in forest enviroment.
Helena H. TANIGUCHI, José Eduardo TOLEZANO, Rui LAROSA, Carlos R. ELIAS, Eunice A. B. GALATI 103-112

- 926 **Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica.**
 Presence of yeasts in the mucosae and feces of apparently healthy individuals and subjects with symptoms of fungal infection
 Jaqueline Otero SILVA, Silvio Antônio FRANCESCHINI e Regina Célia CANDIDO 113-120

Artigo Técnico/ Technical Article

- 927 **Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas**
 Quality Evaluation of Frozen Fruit Pulp
 Silvia M. BUENO, Maria do Rosário V. LOPES, Rejane A. S. GRACIANO, Eliana C. B. FERNANDES e Crispin H. GARCIA-CRUZ 121-126
- 928 **Avaliação de dois sistemas para coleta de sangue de carneiro utilizado no preparo de meios de cultura**
 Evaluation of two systems for sheep blood collection used for preparing culture media
 José Augusto de R. BARBOSA, Evelyn O. SARMENTO, José Eduardo de R. BARBOSA, José Carlos FARACO e Renata S. FONTES 127-130

Comunicação Científica/ Brief Communication

- 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
 Christiane A. RISTORI, Marco A. dos S. PEREIRA e Dilma S. GELLI 131-133

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Avaliação de metodologias para a detecção de insetos, seus fragmentos e de resíduos de terra diatomacea em grãos e farinha de trigo.**
 Atui, M.B 135
- Hazards analysis and critical control point in whole wheat flour processing.**
 Nogueira, M. D 136

AGRADECIMENTOS AOS RELATORES

A COMISSÃO DE REDAÇÃO AGRADECE AOS COLABORADORES DESTA VOLUME

- ADELINO POLINETO - I.A.L. – CENTRAL/Patologia
- ADHEMAR LONGATTO FILHO - I.A.L. – CENTRAL/Patologia
- ANA CÉLIA MANGINI - I.A.L. – CENTRAL/Biologia Médica
- ANA MARIA MARASSA - I.A.L. – CENTRAL/Biologia Médica
- ANA MARIA RAUEN OLIVEIRA MIGUEL - ITAL/Química de Alimentos
- ANGELA CRISTINA R. GHILARDI - I.A.L. – CENTRAL/Biologia Médica
- BERNADETE D. G. M. FRANCO - USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- CARMO ELIAS ANDRADE MELLES - I.A.L./Laboratório Regional de Ribeirão Preto
- DEBORAH I. T. FAVARO - IPEN/CNEN
- DENISE MARIA E. FORMAGGIO - DIR XXI/Núcleo Regional de Saúde de Caraguatatuba
- DILZA BASSI MANTOVANI - ITAL/Química de Alimentos
- ELIANA ROXO - INSTITUTO BIOLÓGICO/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal
- FLÁVIO ANTONIO LAZZARI - UNIVERSIDADE FEDERAL do PARANÁ
- FLÁVIO LUIS SCHMIDT - ITAL/Tecnologia de Frutas
- JAIME AMAYA FARFAN - UNICAMP/FEA
- JOÃO ARISTEU ROSA - UNESP/Araraquara
- JOSÉ RICARDO GONÇALVES - ITAL/ Instituto de Tecnologia de Alimentos
- JOVITA MADEIRA - FUNED/Instituto Octávio Magalhães - Núcleo de Micologia e Micotoxinas
- KIMIYO NONOYAMA - I.A.L. - CENTRAL/Patologia
- LETICIA A. F. NAGATO - I.A.L. – CENTRAL/Bromatologia e Química
- LIGIA B. de ALMEIDA MURADIAN - USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- LIRENY GONÇALVES - UNICAMP/FEA
- LUCIA BALDASSI - INSTITUTO BIOLÓGICO/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal
- LUCIA VALENTE SOARES - UNICAMP/FEA
- MARIA ANTONIA CALORI DOMINGUES - ESALQ/Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
- NEURA HIDALGO - CVE/SP
- NIVALDO BACCAN - UNICAMP/Instituto de Química
- PAULO AUGUSTO ACHUCARRO SILVEIRA - HOSPITAL DAS CLÍNICAS/Fundação Pró-Sangue
- PAULO CAPEL NARVAI - USP/Faculdade de Saúde Pública
- PEDRO PAULO CHIEFFI - USP/Instituto de Medicina Tropical
- PRIMAVERA BORELLI - USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- QUEENIE SIU HANG CHUI - IPT/Instituto de Pesquisas Tecnológicas
- ROGÉRIO P. TOCCHINI - ITAL/ Instituto de Tecnologia de Alimentos
- ROSEMAR ANTONIASSI - EMBRAPA/Agroindústria de Alimentos
- SANDRA REGINA BRASIL STOLF PUKINSKAS - I.A.L. – CENTRAL/Biologia Médica
- SILVANA DE COUTO JACOB - INCQS/FIOCRUZ
- SYLVIA CARDOSO LEÃO - UNIFESP/Escola Paulista de Medicina
- VALÉRIA JUNQUEIRA - ITAL/Instituto de Tecnologia de Alimentos
- VERA AKIKO MAIHARA - IPEN/CNEN
- VICTOR EDUARDO ARRUA ARIAS - FMUSP/Hospital das Clínicas

Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000.

Olive oil: adulteration from 1993 to 2000

Sabria AUED-PIMENTEL^{1*}

Emy TAKEMOTO¹

Regina S. MINAZZI-RODRIGUES¹

Elza S. G. BADOLATO¹

RIALA6/920

Aued-Pimentel, S. et al. - Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):69-75, 2002

RESUMO. No período de janeiro de 1993 a setembro de 2000 foram analisadas no Instituto Adolfo Lutz 236 amostras de azeites de oliva sendo que em todas as amostras foi verificada a pureza através da análise do perfil de ácidos graxos. Em 136 amostras foi também verificado se a qualidade do produto era condizente com a classificação da rotulagem. As medidas de absorção no espectro ultravioleta, em 232 e 270 nm foram os parâmetros empregados nesta avaliação. Foram observadas adulterações em 43 amostras (18,2%) sendo que o principal tipo de fraude foi adição de óleos vegetais de menor valor comercial, principalmente soja. Quanto a classificação da rotulagem, 7 amostras, das 136 analisadas (5,1%), apresentaram classificação não condizente com a qualidade declarada. Verificou-se que do total de amostras 77 foram colhidas pela Vigilância Sanitária, sendo que destas 67 foram colhidas entre os anos de 1997 a 2000, em decorrência dos programas conjuntos estabelecidos entre o Instituto Adolfo Lutz e o Centro de Vigilância Sanitária.

PALAVRAS-CHAVE. azeite de oliva, adulteração, parâmetros de qualidade e identidade.

INTRODUÇÃO

No Brasil não há produção comercial de azeite de oliva sendo que a demanda interna é atendida por azeites importados de países da Europa e da Argentina. O mercado de azeite no Brasil tem crescido nos últimos anos. Entre 1996 e 1998 houve um aumento de quase 44%, isto é, a importação subiu de 16

para 23 mil toneladas (21). Devido as suas características sensoriais excepcionais e a uma produção limitada, o azeite de oliva apresenta elevado valor de mercado, sendo alvo frequente de adulterações (7,11,12,14,20). A adulteração mais comum é a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial (12,18,19,24), principalmente quando o azeite é enlatado no Brasil (2,3,4,5,6,22,23). Entretanto outras fraudes

¹ Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz São Paulo, SP - Brasil.
Endereço para Correspondência - Av. Dr. Arnaldo 355 - CEP 01246902
e-mail spimente@ial.sp.gov.br

relativas à qualidade do azeite são praticadas devido às diferentes categorias de azeites existentes, o que pode confundir os consumidores (1,7,13). O azeite de oliva de melhor qualidade é conhecido como extra-virgem e é obtido da primeira prensagem à frio das olivas. Outros azeites de oliva de aroma e sabor de boa qualidade, porém com valores maiores de acidez, são classificados como fino e semi-fino. Categorias de qualidade inferior incluem o azeite refinado, e o puro, sendo que este é uma mistura de azeite virgem e refinado e o tipo mais encontrado no mercado brasileiro. O azeite “lampante”, é um azeite virgem, impróprio para o consumo humano por apresentar sabor e aroma indesejáveis, originário de olivas de má qualidade.

O azeite de “orujo” é obtido pela extração com solventes dos resíduos de prensagem das olivas. Tanto o azeite “lampante” como o “orujo” devem ser refinados para tornarem-se próprios ao consumo humano (7,8,15,20). O Conselho Oleícola Internacional (COI) e a Comissão do Codex Alimentarius (FAO/WHO), têm estabelecido critérios de qualidade e identidade para as diferentes categorias de azeite de oliva (9,17). Recentemente foram revistos no Brasil os Padrões de Qualidade e Identidade de diversos óleos vegetais, entre eles o azeite de oliva, sendo que estes constam na Resolução 482/99 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e inspiram-se nos critérios internacionais acima referidos (8). Estes padrões fornecem subsídios para a aplicação das exigências legais, contidas no Código de Defesa do Consumidor brasileiro e outras legislações pertinentes, quanto a qualidade dos produtos, pois podem indicar descrições, classificações impróprias de qualidade e/ou adulterações do azeite de oliva comercializado no Brasil.

O Instituto Adolfo Lutz vem, há muitos anos, divulgando resultados de monitoramento da qualidade dos azeites de oliva analisados naquele Instituto. Entre os anos de 1979 e 1980, BADOLATO e colaboradores (6) analisaram 190 amostras de azeites de oliva e constataram que todas as amostras envasadas no país de origem eram puras, enquanto 42% das amostras envasadas no Brasil estavam adulteradas. Entre os anos de 1985 a 1990, outro levantamento mostrou que de 91 amostras analisadas, 19 estavam adulteradas (21 %) (2).

Em 1995 um estudo com 23 amostras de diferentes marcas, compradas no comércio da cidade de São Paulo, constatou adulterações em 6 amostras. Verificou-se que 5 amostras estavam adulteradas com outros óleos vegetais de menor valor comercial. Constatou-se, também, que em 4 amostras a qualidade declarada na rotulagem não era condizente com o produto (4,5).

O presente trabalho tem o objetivo de divulgar um levantamento sobre a adulteração de azeites de oliva analisados no Instituto Adolfo Lutz no período de janeiro de 1993 a setembro de 2000, evidenciando um melhor controle das diferentes categorias de azeites comercializados no Brasil e a crescente atuação do Serviço de Vigilância Sanitária na fiscalização deste produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Material:

Foram analisadas no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Central - SP), entre os anos de 1993 e 2000, 236 amostras de azeites de oliva colhidas e enviadas por diversas fontes: Vigilância Sanitária, PROCON, Departamento Estadual de Polícia do Consumidor -DECON, Instituto Nacional de Metrologia - IPEN, Instituto de Pesos e Medidas - INMETRO, empresas importadoras, entre outros.

Métodos:

Foi determinada a composição de ácidos graxos de todas as amostras para verificar a presença de outros óleos vegetais em mistura. Os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos segundo metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (16). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia em fase gasosa e separados em coluna capilar de sílica fundida, com fases estacionárias polares (polietileno glicol ou ciano propil siloxana). A identificação foi feita pelo tempo de retenção através da co-cromatografia utilizando padrões puros dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. A quantificação foi feita por normalização de área.

Em 136 amostras foram feitas medidas de absorção no espectro ultravioleta em 232 e 270 nm. A leitura de absorção do azeite no UV, nos comprimentos de onda 232 e 270 nm, fornecem informações para diferenciar as categorias do azeite, isto é: virgem, puro (mistura de virgem e refinado) e refinado. A metodologia empregada seguiu a Norma Internacional recomendada para o azeite de oliva pelo Codex Alimentarius (10). As leituras foram feitas em espectrofotômetro, com cubetas de quartzo, nas soluções do óleo em ciclohexano, a 0,2% e 1% (p/v) em 232 e 270 nm, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta um resumo sobre as características das amostras de azeites de oliva analisadas no Instituto Adolfo Lutz, ano a ano, no período de janeiro de 1993 a setembro de 2000.

Avaliando as 236 amostras de azeite de oliva analisadas, e considerando as determinações realizadas, foi constatado que 43 amostras, isto é, 18,2% apresentaram algum tipo de adulteração (Figura 1). Destas, 39 estavam adulteradas com outros óleos vegetais de menor valor comercial. Em 31 amostras observou-se a presença de óleo de soja como adulterante, sendo que 29 eram amostras envasadas no Brasil. Em 5 amostras o provável adulterante era o óleo de girassol, sendo 2 amostras envasadas no Brasil e 2 na Argentina. Uma amostra foi encaminhada por um importador como azeite de oliva à granel, entretanto constatou-se que tratava-se de óleo de colza. Duas amostras, envasadas no Brasil, estavam adulteradas com gordura vegetal

Tabela 1. Azeites de oliva analisados no Instituto Adolfo Lutz entre janeiro de 1993 a setembro de 2000

ANO	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
AMOSTRAS	42	8	36	23	36	17	43	31
Procedência	05-Vigilância Sanitária => 10-DECON => 9 adulteradas 03 - PROCON 24 - Importadoras => 5 adulteradas	04- Vigilância Sanitária => 01 adulterada 04- Importadoras => 03 Adulteradas	13- Importadoras => 01 adulterada 23 - Adquiridas do comércio de SP => 06 adulteradas	01-Vigilância Sanitária 01-PROCON 02-Polícia Federal 19-Importadoras => 02 adulteradas	23-Vigilância Sanitária PROGRAMA LAL-CVS => 01 adulterada 10 - Importadoras 02- Ministério Público 01- DECON	11 - Vigilância Sanitária 02- DECON 01-Fundação de Defesa do Consumidor 03 - Importadoras	12-Vigilância Sanitária => 05-adulteradas 01-IPEM - Instituto de Pesos e Medidas 12-Importadoras => 03-adulteradas 18-INMETRO => 01-adulterada 01-Instituto Nacional de Metrologia	21-Vigilância Sanitária => 03-adulteradas 02-adulteradas 06-Importadoras 01-PROCON => 01 adulterada
País de origem das amostras	19 argentinos -17 envasados no Brasil 10 espanhóis 02 italianos 01 português 10 à granel *	06 argentinos -05 envasados no Brasil 02 à granel *	13 argentinos - 08 envasados no Brasil 05 português 07 espanhóis 01 italiano 10 à granel *	05 argentinos - 04 envasados no Brasil 05 espanhóis 04 italianos 09 à granel)	12 argentinos - 07 enlatados no Brasil 07 espanhóis 09 portugueses 02 gregos 01 italiano 05 à granel *	02 argentinos - 01 envasado no Brasil 02 espanhóis 02 espanhóis 07 portugueses 01 turquia 01 italiano 01 grego 03 à granel *	18 argentinos - 12 envasados no Brasil 08 espanhóis 12 portugueses 01 grego 04 à granel *	13 argentinos - 07 envasados no Brasil 07 espanhóis 09 portugueses 02 à granel *
Amostras adulteradas	14	04	07	02	01	00	09	06
- Adição de outros óleos vegetais a qualidade	13 => ad. óleo soja 01 => ad. óleo de colza	02 => ad. óleo de soja 02 => ad. óleo de girassol	03 => ad. óleo de girassol 02 => ad. gordura vegetal hidrogenada 01 => ad. óleo de soja	02 => adição de óleo de soja	01 => adição de óleo de soja		06 => adição de óleo de soja	06 => adição de óleo de soja
- Dizeres de rotulagem em desacordo com a qualidade	Não avaliado	Não avaliado	Avaliadas 23 amostras 04 em desacordo	Não avaliado	Avaliadas 27 amostras - nenhuma em desacordo	Avaliadas 15 amostras - nenhuma em desacordo	Avaliadas 40 amostras - 03 em desacordo	Avaliadas 31 amostras - nenhuma em desacordo
- Origem das amostras adulteradas com outros óleos vegetais	13 envasadas no Brasil	01 envasada no Brasil 01 à granel *	02 envasadas na Argentina 04 envasadas no Brasil	01 Origem Espanha - à granel 01 à granel *	01 envasada no Brasil -	05 envasadas no Brasil 01 sem procedência	06 envasadas no Brasil	
- Origem das amostras com dizeres de rotulagem em desacordo			03 envasadas no Brasil 01 envasada na Argentina					01 Azeite grego 01 à granel origem Argentina 01 à granel *

* óleos sem procedência conhecida

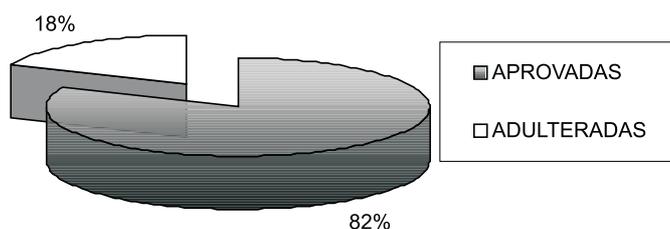


Figura 1. Incidência de adulteração em amostras de azeite de oliva analisadas no Instituto Adolfo Lutz 1999 – 2000 - total de amostras: 236

Quadro 1. Composição de ácidos graxos no azeite de oliva (8)

Ácido graxo	Nomenclatura	g/100g
C 14:0	Mirístico	≤0,05
C 16:0	Palmitico	7,5 - 20,0
C 16:1	Palmitoléico	0,3 - 3,5
C 17:0	Margárico	<0,3
C 17:1	Heptadecenóico	<0,6
C 18:0	Esteárico	0,5 - 5,0
C 18:1	oléico	55,0 - 83,0
C 18:2	linoléico	3,5 - 21,0
C 18:3	linolênico	≤0,9
C 20:0	araquídico	≤0,6
C 20:1	eicosenóico	≤0,4
C 22:0	behênico	≤0,2
C 24:0	Lignocérico	≤0,2

Quadro 2. Valores das absorções específicas a 270 e 232 nm para os diferentes tipos de azeites (8).

Produto	K ₂₇₀	K ₂₇₀ com alumina (1)	K ₂₃₂
Azeite virgem extra	≤0,20	≤0,10	≤2,50
Azeite virgem	0≤,25	≤0,10	≤2,60
Azeite virgem comum	≤0,25	≤0,10	≤2,60
Azeite refinado	≤1,20	-	≤3,40
Azeite	≤1,00	-	≤3,30
Azeite virgem lampante	≤0,25	≤0,11	≤3,70
Óleo de bagaço e/ou caroço refinado	≤2,50	-	≤5,50

(1) Para verificar a presença de óleos refinados, quando K₂₇₀ exceder o limite da categoria correspondente deve proceder a determinação de K₂₇₀ após passagem por coluna de alumina.

hidrogenada. Este tipo de adulteração é incomum e só pôde ser confirmada através do perfil de ácidos graxos obtido em coluna cromatográfica capilar de alta resolução, onde foram separados os trans isômeros dos ácidos graxos insaturados, presentes em gorduras hidrogenadas. Nestas amostras de azeite estes compostos estavam presentes em grande proporção, configurando a adulteração. As Figuras 3 e 4 mostram cromatogramas com o perfil de ácidos graxos de amostras de azeite de oliva puro, falsificado com óleo de soja e com gordura vegetal hidrogenada, respectivamente No Quadro 1 constam os intervalos previstos para a composição dos ácidos graxos do azeite de oliva, segundo a Resolução 482/99 da ANVISA.

Foi avaliada em 136 amostras a qualidade dos azeites em função da categoria declarada no rótulo. As medidas da absorção específica no ultravioleta, em 232 e 270 nm, foram os parâmetros utilizados nesta avaliação. São estabelecidos limites para os valores de absorção naqueles comprimentos de onda, para cada categoria de azeite (Quadro 2). O aumento da absorção naquelas regiões do ultravioleta são indicativos da presença de compostos dienos e trienos conjugados formados, a partir de ácidos graxos insaturados, durante o processo de refino dos óleos (7). Em 7 amostras (5,1%) a classificação apresentada na rotulagem não era condizente com a qualidade do produto. As rotulagens indicavam tratar-se de azeite virgem, entretanto, os valores obtidos para as absorções no UV eram de azeites de oliva puro, isto é, uma mistura de azeite virgem e refinado, sendo este de qualidade inferior à declarada. Das 7 amostras, 3 eram azeites envasados no Brasil, 2 azeites envasados na Argentina, 1 azeite grego e uma amostra de azeite à granel de procedência desconhecida.

Noventa e uma amostras (38,5%) foram encaminhadas para análise por empresas importadoras, visando verificar a qualidade dos produtos para efetivar a importação.

A Figura 2 mostra, ano a ano, o total de amostras analisadas, o número de adulteradas e de colhidas pelo Serviço de Vigilância Sanitária. No total Foram colhidas 77 amostras, isto é 32,6% do total, sendo que 67 entre os anos de 1997 a 2000, em decorrência dos programas conjuntos estabelecidos entre o Instituto Adolfo Lutz e o Centro de Vigilância Sanitária. Treze amostras foram encaminhadas pelo DECON, Departamento Estadual de Polícia do Consumidor; 5 pelo PROCON; 21 pelo INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia; 1 pelo IPEM Instituto de Pesos e Medidas; 2 pela Polícia Federal; 1 pela Fundação de Defesa do Consumidor. Em 1995 foram adquiridas do comércio da cidade de São Paulo, 23 amostras de azeite de oliva, para a realização de um estudo de monitoramento da qualidade dos azeites de oliva (4,5)

Com relação à procedência das amostras verificou-se a seguinte distribuição: 88 eram de origem argentina sendo 61 destas envasadas no Brasil; 46 espanholas; 9 italianas; 43 portuguesas; 4 gregas; 1 da Turquia e 45 amostras sem procedência conhecida.

Cabe ressaltar que os parâmetros utilizados na avaliação dos azeites, no presente trabalho, não são suficientes para

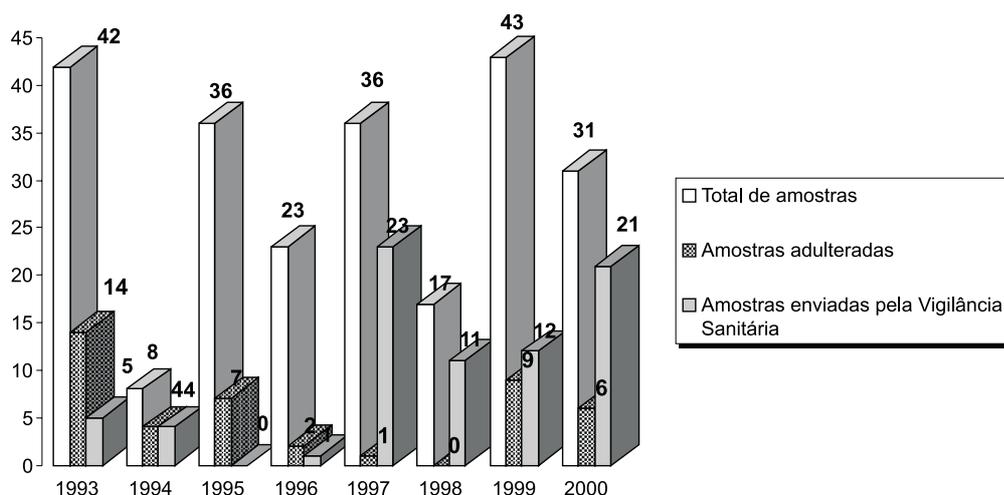


Figura 2. Amostras de azeites de oliva analisadas no Instituto Adolfo Lutz entre os anos de 1993 a 2000

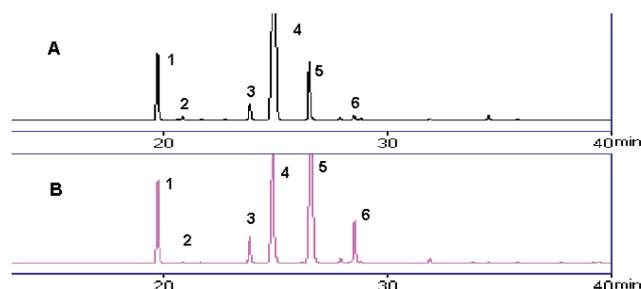


Figura 3. Cromatogramas de amostras de azeites de oliva puro (A) e adulterado com óleo de soja (B) Condições cromatograficas: Coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m; 0,25 µm; 0,25 mm di. Temperatura programada da coluna: 60 °C (2min); 3°C/min.; 135 °C (1min.); 3°C/min; 215 °C (5min.). Temperaturas do injetor e detector = 220 °C. Detector de ionização de chama. Gás de arraste hidrogênio. Velocidade linear de: 40cm/s

Composição dos principais ácidos graxos (%):

	A	B
1 Ácido palmítico (C16:0)	9,7	11,1
2 Ácido palmitoléico (C16:1 cis 9)	0,6	0,1
3 Ácido esteárico (C18:0)	2,9	3,5
4 Ácido oléico (C18:1 cis 9)	75,1	25,4
5 Ácido linoléico (C18:2 cis 9,11)	9,0	52,3
6 Ácido linolênico (C18:3 cis 9,11,15)	0,7	5,5

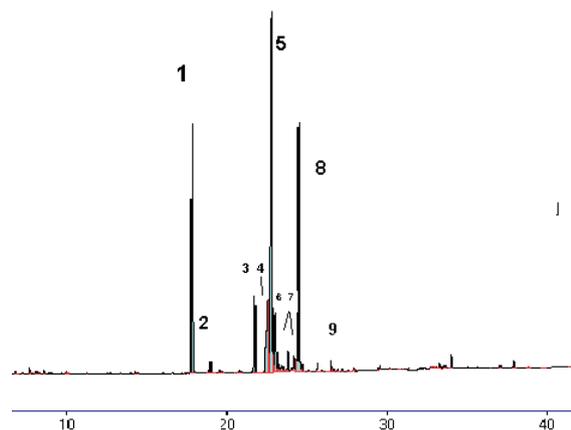


Figura 4. Cromatogramas de amostra de azeite de oliva adulterado com gordura vegetal hydrogenada. Condições cromatograficas: Coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m; 0,25 µm; 0,25 mm di. Temperatura programada da coluna: 80 °C (1min); 5°C/min. 220 °C (6min.). Temperaturas do injetor e detector = 220 °C. Detector de ionização de chama. Gás de arraste hidrogênio. Velocidade linear de: 40cm/s.

Composição dos principais ácidos graxos (%):

1 Ácido palmítico (C16:0)	11,7
2 Ácido palmitoléico (C16:1 cis 9)	0,6
3 Ácido esteárico (C18:0)	3,7
4 Trans isômeros do ácido C18:1	9,4
5 Ácido oléico (C18:1 cis 9)	48,3
6 Ácido vacênico (C18:1 is 11)	3,2
7 Trans isômeros do ácido C18:2	2,6
8 Ácido linoléico (C18:2 cis 9,11)	13,0
9 Ácido linolênico (C18:3 cis 9,11,15)	0,6

assegurar a qualidade e identidade dos mesmos. Através da composição de ácidos graxos e das medidas de extinção específica no espectro UV foi possível detectar as fraudes mais grosseiras. A avaliação de diversos outros parâmetros como: composição de esteróis, conteúdo de eritrodio e uvaol, composição de triacilgliceróis, entre outros, que estão contemplados na Resolução 482 (8), é possível avaliar com mais segurança a identidade e qualidade dos azeites. Desta forma, é de fundamental importância o aprimoramento técnico dos laboratórios brasileiros no controle de óleos vegetais, pois uma avaliação mais refinada, poderá indicar índices ainda mais elevados de adulteração nos azeites comercializados no Brasil.

CONCLUSÕES

Considerando os parâmetros analisados conclui-se que: Das 236 analisadas, 43 amostras (18,2%) apresentaram algum tipo de adulteração.

Em 39 amostras foi observada a adição de óleos vegetais

de menor valor comercial no azeite de oliva, sendo que em 31 delas o óleo de soja foi o adulterante. A maioria das amostras foram envasadas no Brasil (33) e eram de origem argentina.

Quanto à classificação de rotulagem, das 136 amostras avaliadas 7 apresentaram no rótulo a classificação de azeite de oliva virgem, entretanto verificou-se tratar-se de apenas azeite de oliva, uma mistura de azeite virgem e refinado com qualidade inferior ao azeite virgem.

A partir de 1997 o número de amostras de azeites de oliva colhidas pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo aumentou sensivelmente, em decorrência dos programas conjuntos estabelecidos entre o IAL e a Vigilância Sanitária. Fica ressaltada, desta forma, a importância do desenvolvimento de programas desta natureza a fim de contribuir para a garantia da qualidade dos produtos oferecidos à população.

Os parâmetros utilizados na avaliação dos azeites, no presente trabalho, não são suficientes para assegurar a qualidade e identidade dos mesmos. É necessário um aprimoramento técnico dos laboratórios brasileiros para o controle de adulterações mais elaboradas no azeite de oliva.

RIALA6/920

Aued-Pimentel, S. et al. - Olive oil: adulteration from 1993 to 2000. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):69-75, 2002

ABSTRACT. In the period of January 1993 to September 2000 were analyzed at Adolfo Lutz Institute 236 samples of olive oils and in all of the samples the purity was verified through the analysis of the fatty acids profile, using gas chromatographic techniques. In 136 samples it was also verified if the classification on the label was in accordance with the quality. The absorption measures in the ultraviolet spectra, at 232 and 270 nm were the parameters evaluated. It was observed that 43 samples (18,2%) were adulterated and the main fraud type was the addition of vegetable oils of lower commercial value, mainly soybean oil. Considering the label evaluation, 7 samples (5,1%), of the 136 analyzed, presented incorrect quality classification. It was verified that from the total samples, 77 were picked by the Sanitary Survey Watch and, of these, 67 were picked from 1997 to 2000, due the cooperation programs established from 1997 between the Adolfo Lutz Institute and the Center of Sanitary Survey Watch of the State of São Paulo.

KEY WORDS. olive oil, adulteration, quality and identity parameters.

REFERÊNCIAS

1. Antoniassi, R. et al. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Braz. J. Food Technol.**, 1(1/2): 32-43, 1998.
2. Aued, S. Adulteração de azeite de oliva. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, 1(1):8, 1991.
3. Aued-Pimentel, S. et al.- Avaliação de parâmetros físicos e químicos no estudo da adulteração do azeite de oliva. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, 54 (2): 69-77, 1994.
4. Aued-Pimentel, S. et al. Monitoramento da qualidade de azeite de oliva comercializados na cidade de São Paulo. In: **6º Congresso e Exposição Latinoamericano sobre Processamento de Óleos e Gorduras**, Campinas, 1995.
5. Aued-Pimentel, S. et al. Multivariate analysis applied to quality assessment of olive oil commercialized in São Paulo, Brazil. In: **World Conference on Oilseed and Edible Oils. Processing, 1996 Istanbul. The Proceedings of World Conference on oilseed and Edible Oils Processing.** Champaign, Illinois, AOCS Press, 1998. v.II. p.205 - 211

6. Badolato, E.S.G. et al. Óleo de oliva - Avaliação de sua qualidade. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 41(1):63- 70, 1981.
7. Boskou, D. **Olive oil: chemistry and technology**. AOCS Press, Champaign, IL,1996. 161p.
8. Brasil, Leis, decretos, etc. Resolução nº 482/99 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial**, Brasília, 13 out. 1999. Seç. I, nº196-E, p. 82-87. Aprova o Regulamento Técnico referente a Óleos e Gorduras Vegetais, constante do anexo desta Resolução (Anexo 13: Azeite de oliva).
9. Codex Alimentarius Commission. In: **Fats, Oils and Related Product**. Rome, FAO/WHO, vol. 8, p. 41-47, 1993. (Codex Stan 33-1981).
10. Codex Alimentarius Commission. **Codex standards for edible fats and oils**. Rome,FAO/WHO, 1987, p. 46-75, (CAC -vol. 17).
11. Dionisi, F.; Prodolliet, J.; Tagliaferri. Assessment of olive oil adulteration by reversed phase high performance liquid chromatography/ amperometric detection of tocopherols and tocotrienols. **J. Am. Oil Chem.Soc.**, 72(12):1505-1511, 1995.
12. Fellat-Zarrouck, K.; Boutellier, J.C.; Maurin, R. – HPLC detection of adulterations of olive oil by seed oils. **Rev. Fran.Corps Gras**, 35(10):383-385, 1995.
13. Firestone, D. et al. Detection of adulterates and misbranded olive oil products. **J. Am. Oil. Chem.Soc**, Champaign, 62: 1558-1562, 1985.
14. Flor, R.V.; Tiet, L.T.- Development of HPLC criteria for determination of purity of commercial olive oils. **U.S.Customs Serv. Tech.Bull.**, 18(3): 75-90, 1994.
15. Gracian, J. The chemistry and analysis of olive oil. In: BOEKENOOGEN, H.A. **Analysis and Characterization of oils, fats and fat products**, Interscience Publishing, London, 1968, vol. 2, p.317-591.
16. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo).**Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. . v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3º ed. São Paulo, IMESP, 1985, p. 245-66.
17. International Olive Oil Council. Trade Standard Applying to Olive Oil and Olive-Pomace Oil. Resolution nº Res-2/80-IV/99 .COI/T.15/NC nº2/Rev.9, 10 june 1999.
18. Kapoulas, V.M.; Andrikopoulos, N.K. Detections of olive oil adulteration with linoleic acid-rich oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J.Chromatogr.**, 366:311-20, 1986.
19. Kapoulas, V.M.; Passoglou-Emmanouilidou, S. Detections of adulterations of olive oil with seed oils by a combination of column and gas liquid chromatography. **J. Am. Oil Chem.Soc**, 586:694-7,1981.
20. Kiritsakis, A.; Markakis, P. Olive oil: a review. **Adv. Food Res.**, 31:453-82, 1987.
21. Morita, A. Tempero no azeite. **Supermercado Moderno**. Janeiro: 24-31, 2000.
22. Soares, L.V.; Rodrigues-Amaya, D. Identificação e quantificação de adulterantes em óleo de oliva por cromatografia gasosa. **Bol SBCTA**, 15(1):1-17, 1981.
23. Szpiz, R.R.; Pereira, D.A.; Jabloonka, F.H. Avaliação de óleos comestíveis comercializadas no Rio de Janeiro, **Boletim de Pesquisa**,13, EMBRAPA-CTAA, 1985. 11p.
24. Tsimidou, M.; Macrae, R.; Wilson, I. Authentication of virgen olive oil using principal component analysis of triglyceride profiles: Part 2- Selection of adulteration with other vegetable oils. **Food Chem.**, 25:.251-8, 1987.

Recebido em 05/06/2001; Aprovado em 01/10/2001

Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado, com sangue bovino, utilizando a técnica de leito de jorro

Proteinic improvement of deffated rice bran, with bovine blood, using the spouted bed technique

André F. MASSARO¹
Luiz Antonio de A. PINTO^{1*}

RIALA6/921

Massaro, A. F.; Pinto, L. A. de A.. Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado, com sangue bovino, utilizando a técnica de leito de jorro. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):77-84, 2002.

RESUMO O referido trabalho teve como objetivo promover o enriquecimento protéico do Farelo de Arroz Desengordurado (FAD), na forma de *Pellets*, pelo recobrimento e adsorção de sangue bovino, em leito de jorro, obtendo um produto final com teor protéico de 25%, destinado à ração animal. Foram utilizados como matéria-prima o FAD, e o sangue bovino. O processo de enriquecimento protéico foi desenvolvido em um leito de jorro cônico, com célula de vidro temperado, com 22 cm de diâmetro e capacidade para 860 g de farelo. Os experimentos foram realizados segundo uma matriz de planejamento experimental fatorial completo (2³), sendo três fatores em dois níveis de variação, com ponto central: diluição – sangue/água (1/1, 1,5/1, 2/1), Vazão de alimentação de sangue (600, 700 e 800mL/h) e temperatura (70, 80 e 90°C), tendo como resposta a proteína bruta e o rendimento em massa. Os melhores resultados para o produto foram: rendimento de 82,31%, e 23,81% de proteína, obtidos com diluição de 1/1, vazão de alimentação de 800 mL/h e temperatura de 70° C.

PALAVRAS-CHAVE: Enriquecimento protéico, Farelo de arroz, Ração animal.

INTRODUÇÃO

A produção agropecuária da região Sul do estado do Rio Grande do Sul sempre se destacou nacional e internacionalmente em grande parte pelo cultivo do arroz, envolvendo milhares de trabalhadores, grande área de plantio e altos investimentos governamentais e privados no setor. Para escoar e beneficiar toda esta produção, várias indústrias se estabeleceram, determinando mais uma base sócio-econômica para a região, e também gerando uma série de sub-produtos do beneficiamento

que merecem toda a atenção dos órgãos de pesquisa e desenvolvimento como as universidades. Por se tratarem, muitas vezes, de composições ricas em nutrientes alimentícios, estes sub-produtos são alvo de interesse para a reutilização, visto que, muitas vezes são descartados ao meio ambiente, ou compõem formulações de baixo valor agregado^{1,4}.

Como um dos sub-produtos de grande interesse está o farelo resultante do beneficiamento de arroz, que após a extração do óleo, resulta no Farelo de Arroz Desengordurado (FAD), que se apresenta na forma de *Pellets*, resultantes do processo de

^{1*} Endereço para correspondência – Fundação Universitária do Rio Grande/RS.

extrusão (*Pelletização*), com alta estabilidade⁶. O FAD possui cerca de 15% de proteínas e fibras, apresenta como principais minerais cromo e cobre, que tem importante papel na formação de insulina, zinco e magnésio, importantes para o desenvolvimento, e vitamina A¹².

O Farelo de Arroz Desengordurado *Pelletizado* é utilizado como componente de formulação de rações para animais, com a complementação de micronutrientes, apresentando-se como um produto com teor protéico de aproximadamente 14%.

Outra atividade agropecuária importante economicamente para a região é o abate e industrialização de gado de corte, em frigoríficos.

A operação de abate gera alguns resíduos e subprodutos, como o sangue bovino, de grande interesse para as pesquisas em alimentos, para utilização direta e indireta na alimentação humana, devido a suas características nutricionais⁷.

O sangue é um rejeito rico em proteínas e ferro que pode contribuir na suplementação do nível protéico e fortificação dos alimentos com ferro, eliminando e diminuindo a anemia ferropriva^{2,3}. Porém é subutilizado na produção de farinha para animais, ou então, no caso de pequenos frigoríficos, despejado em rios, contribuindo assim para a eutrofização e poluição do manancial hídrico¹⁵.

A utilização mais usual do sangue bovino, como componente de produtos de alto valor agregado, é na indústria de produtos cárneos, onde o sangue integral ou suas frações podem ser utilizados como enriquecedor ou substituto de proteínas. Uma das formas mais tradicionais de recuperação das proteínas do sangue é a secagem, que deve ser desenvolvida em condições estritamente controladas, para evitar a desnaturação protéica, o que alteraria completamente as propriedades funcionais, solubilidade, digestibilidade, capacidade de emulsificação, e formação de gel¹⁴.

As principais características do recobrimento em leito de jorro é o movimento cíclico do material produzindo uma rápida mistura axial das partículas no leito e um eficiente contato gás-partícula o que proporciona altas taxas de transferência de calor e massa, característica fundamental do leito de jorro^{8,13}.

Como sub-produtos da agroindústria da região Sul do estado, o sangue bovino e o Farelo de Arroz Desengordurado se observados separadamente, se apresentam com limitações tecnológicas ou nutricionais para sua utilização em produtos alimentícios¹¹. Por outro lado, se mostram excelentes para a formulação de uma ração animal com alto teor protéico, e alta qualidade protéica em termos de aminoácidos^{11,2,13}. Assim, o trabalho teve por objetivo promover o enriquecimento protéico do Farelo de Arroz Desengordurado (FAD) pelo recobrimento e adsorção de sangue bovino, em leito de jorro utilizando a metodologia do planejamento experimental fatorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-Prima

As matérias primas utilizadas foram Farelo de Arroz Desengordurado (FAD) na forma de *Pellets*, e sangue bovino, coletados diretamente da linha de produção, em empresas dos municípios de Pelotas-RS (Irgovel S/A) e Capão do Leão-RS (Frigorífico Extremo Sul S/A).

EQUIPAMENTO PARA O ENRIQUECIMENTO PROTÉICO

O equipamento utilizado para a realização dos experimentos foi composto de um soprador radial, de 7,5 HP, sistema de aquecimento de ar (resistores quartzo de 2400 W) com controle termostático, válvulas globo para o controle da vazão do ar, célula de enriquecimento protéico, ciclone *Lapple* para a coleta de finos e sistema de aspersão de sangue na célula, com duplo fluido, composto por uma bomba peristáltica e compressor de ar comprimido com regulador de pressão. Para a caracterização do ar de secagem, foram utilizados termômetros de bulbo úmido e bulbo seco, inseridos na tubulação de insuflamento de ar.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do sistema de enriquecimento protéico, inicialmente foi feita a determinação da altura do leito (carga de *Pellets* de FAD), para tal foi necessário o dimensionamento da célula de secagem. A partir da mesma, determinou-se a carga de produto, através do estabelecimento do regime de jorro estável, até a condição de máximo insuflamento de ar.

A determinação da fluidodinâmica do leito de jorro é necessária, para a verificação do comportamento das partículas no processo, pois este sistema, utilizado amplamente como secador, apresenta as melhores taxas de troca de energia e massa, para uma situação de jorro estável⁹, verificada pela determinação da curva fluidodinâmica. Para a caracterização do processo, obteve-se uma curva fluidodinâmica do leito, através da operação do equipamento em condições de trabalho (*Pellets* de FAD na célula, temperatura de secagem: 60 e 80°C), tendo sido o sistema colocado em condições de operação, com a carga de *pellets* estipulada, e determinando-se vários pontos de leitura para a perda de carga na célula e na placa de orifício (manômetros em "U"), conforme o fluido de secagem (ar) escoava pela tubulação. Os pontos foram obtidos mediante a abertura gradual das válvulas de controle de ar, com vazões crescentes e decrescentes (válvula de entrada e válvula de alívio). Os pontos foram tomados desde a leitura mínima possível (variação perceptível), até o momento em que o jorro tornou-se pneumático, sendo determinadas as vazões mínima e máxima de jorro estável.

Para o estudo das condições de enriquecimento dos *Pellets* de FAD foram determinados os fatores de variação, assim como a faixa de operação destes fatores, sendo eles: a temperatura (60 → 90°C); a taxa de alimentação de sangue (600 → 800mL/h),

e o grau de diluição da corrente de sangue (1/1 → 2/1). Estes parâmetros foram estabelecidos pela adaptação do equipamento, e da matéria prima para as melhores condições de recobrimento, através de vários testes preliminares, e valores de bibliografia. Trabalhos anteriores^{5,10} realizados no laboratório permitiram a escolha destes fatores e sua faixa de variação.

Também foram determinadas características físico-químicas para as amostras das matérias primas e do produto final, de acordo com os métodos padronizados para cada análise.

DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA E RENDIMENTO NO PRODUTO FINAL

A proteína bruta das amostras enriquecidas foi determinada segundo o método Macro Kjeldahl nº 979.09 da A.O.A.C, sendo todas as análises realizadas no próprio laboratório de desenvolvimento do trabalho¹.

Para a determinação do rendimento, considerou-se a massa total envolvida no processo como base, e buscou-se como valor teórico final para os *Pellets* enriquecidos, um teor de proteína bruta de 25%, de acordo com as características de um produto base para a composição de uma ração animal. Foi realizado um balanço de massa e proteína, envolvendo o farelo de arroz desengordurado *in natura*, e o sangue bovino, sendo considerados seus valores iniciais de proteína bruta, individualmente. Para o cálculo, determinou-se a igualdade entre os componentes de entrada e o produto de saída, considerando-se a massa e o teor de proteína (em base seca, pois os valores de umidade inicial dos *pellets* e do produto final foram considerados indiferentes), $ma.pa + ms.ps = mf.pf$, onde: *ma* é a massa de *pellets*, *ms* é a massa de sangue e *mf* é a massa final, assim como *pa* é o teor protéico dos *pellets*, *ps* é o teor protéico do sangue e *pf* é o teor protéico do produto final. Como valores conhecidos teve-se: massa de *pellets*, teor de proteína dos *pellets*, teor de proteína do sangue, massa de produto final (*ms+ma*), e proteína do produto final.

Assim, pôde-se através do valor determinado para a proteína do produto final, em 25%, determinar a massa de sangue teórica necessária para alcançar-se este valor. O rendimento do processo foi determinado pela diferença entre a massa total em base seca, de *pellets* e sangue, e a massa de produto final obtido, em valores percentuais. Esta diferença ocorre pela perda no processo de leito de jorro (arraste pelo insuflamento de ar) e aderência do material na célula de secagem

METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Para analisar o enriquecimento protéico do FAD com sangue bovino, utilizou-se um planejamento experimental fatorial completo (2^3) três fatores (diluição-sangue/água, vazão de alimentação de sangue e temperatura), em dois níveis de variação, com ponto central em tréplica, tendo-se como resposta a proteína bruta e o rendimento. Na matriz de planejamento experimental,

os valores das variáveis são representados na forma codificada, sendo os fatores e os respectivos níveis apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental completo (2^3).

Fatores	Níveis		
	-1	Ponto Central	+1
Diluição –sangue/água	1/1	1,5/1	2/1
Vazão de alimentação	600mL/h	700mL/h	800mL/h
Temperatura	70°C	80°C	90°C

A matriz de planejamento experimental foi montada conforme a Tabela 2, apresentada nos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DETERMINAÇÃO DA FLUIDODINÂMICA E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A caracterização fluidodinâmica do processo foi realizada pela obtenção da curva característica de perda de carga na célula de secagem em função do adimensional de velocidade na mesma. Para obter-se os pontos da curva, foi feita a abertura gradual da válvula de insuflamento de ar para a célula de enriquecimento protéico, e foi feita então a leitura da perda de carga, no manômetro em U conectado à célula. A relação v/v_m (adimensional de velocidade – velocidade de operação/ velocidade de jorro mínimo) foi determinada pelo cálculo da velocidade na célula, em cada ponto adotado, através do valor de vazão calculado pela equação do medidor de orifício. As Figuras 1 e 2 apresentam as curvas fluidodinâmicas à 60 e 80°C respectivamente.

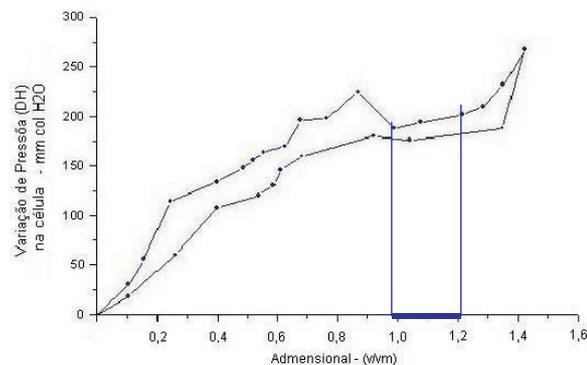


Figura 1. Curva Fluidodinâmica à 60°C do leito de jorro com FAD

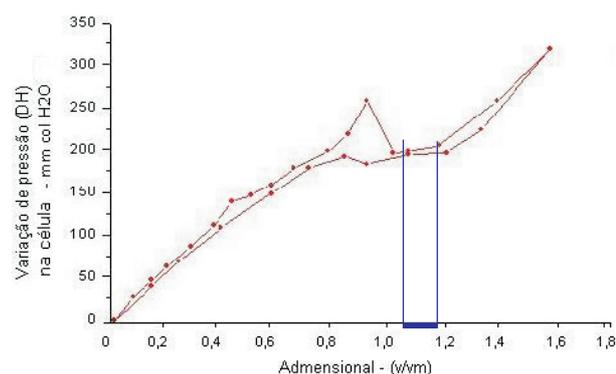


Figura 2. Curva Fluidodinâmica à 80°C do leito de jorro com FAD

Através das curvas, pode-se perceber pelo comportamento do sistema de partículas, as regiões onde o leito de jorro se encontra estável (em destaque nas figuras), sendo determinada a relação de v/vm de trabalho, dentro desta faixa, onde obtém-se as maiores taxas de troca de massa e energia, obtendo-se maior eficiência.

A determinação das características físico químicas das matérias primas foi feita de acordo com os métodos da A.O.A.C., e dos métodos físicos padronizados no laboratório de engenharia química e alimentos da Furg. Todas as análises foram feitas em tréplica, e a caracterização física foi desenvolvida utilizando-se trinta partículas (*Pellet*) de FAD. As Tabela 2 e 3 apresentam os resultados das análises desenvolvidas.

Tabela 2. Caracterização do Sangue Bovino

Determinação	Sangue Bovino
Massa Específica	1,064 ± 0,03 g/cm ³
Viscosidade	22,7cp
Proteína Bruta	16,44 ± 0,12 %
Cinzas	0,70 ± 0,03 %
Umidade	82,25 ± 0,2 %

A caracterização do sangue apresentou valores adequados aos encontrados em bibliografia^{2,3,16}, para a mesma matéria prima.

Os valores encontrados na caracterização do *pellet*, quando comparados com trabalho anterior⁵, desenvolvido no laboratório, e valores da empresa fornecedora da matéria prima, mostraram-se equivalentes, com pequenas variações nas propriedades físicas, provavelmente devido a desgastes e ajustes das máquinas extrusoras.

Tabela 3. Caracterização do *Pellet* de FAD

Determinação	<i>Pellet</i> de FAD
Diâmetro da partícula	9,98 ± 0,31 mm
Esfericidade	0,87 ± 0,04
Massa específica do sólido	1,49 ± 0,23 g/cm ³
Massa específica aparente	1,39 ± 0,28 g/cm ³
Massa específica do leito de partículas	0,67 ± 0,018 g/cm ³
Porosidade do leito de partículas	0,48
Porosidade das partículas	0,068
Proteína bruta	15,5 ± 0,14 %
Cinzas	11,19 ± 0,3 %
Umidade	9,58 ± 0,22 %

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE PROTEÍNA E RENDIMENTO DO PRODUTO FINAL - PELLETS DE FAD ENRIQUECIDOS COM SANGUE BOVINO

Como respostas para o processo de enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado com sangue bovino, são apresentados na Tabela 4 os valores obtidos nas corridas experimentais do trabalho. A primeira coluna apresenta o número das corridas, a seguir apresenta-se os níveis de variação e os valores das respostas.

PROTEÍNA DAS AMOSTRAS DE FAD ENRIQUECIDO COM SANGUE BOVINO

Os valores da proteína foram avaliados no software STATGRAPHICS PLUS 2.1 for Windows, através da análise de variância do planejamento fatorial completo utilizado, conforme apresentado na Tabela 5. Pode-se observar que a diluição, a vazão de alimentação e a temperatura apresentaram significância ao nível de 95% (valores menores que 0,05). As interações entre as variáveis de estudo não se mostraram significativas. A análise não sofreu interferências das amostras utilizadas, pois não houve influência dos blocos.

A Figura 3, mostra o gráfico dos efeitos principais para proteína. Observa-se que a vazão de alimentação de sangue influencia o teor de proteína positivamente, ou seja, as amostras de FAD enriquecidas na maior vazão, apresentaram um teor protéico maior, porém, analisando-se os efeitos isoladamente, a diluição e a temperatura influenciaram a resposta de forma inversa, isto é, as amostras de FAD enriquecidas na maior diluição e maior temperatura apresentaram baixo teor de proteína.

O cubo de resposta para a proteína do FAD enriquecido com sangue bovino permite a visualização da melhor região de

Tabela 4. Matriz de Planejamento Experimental Completo (2³), com ponto central, para as respostas de proteína bruta e rendimento.

Nº	Diluição	Vazão de Alimentação - sangue (ml/h)	Temperatura °C	Proteína (%)	Rendimento (%)
1	1:1	600	70	21,57	81,60
2	1:2	600	70	23,71	79,94
3	1:1	800	70	22,79	82,16
4	1:2	800	70	24,56	82,71
5	1:1	600	90	20,55	77,16
6	1:2	600	90	23,86	76,05
7	1:1	800	90	21,25	78,83
8	1:2	800	90	23,69	78,27
1*	1:1	600	70	22,09	80,49
2*	1:2	600	70	23,47	81,05
3*	1:1	800	70	22,95	81,60
4*	1:2	800	70	23,85	81,60
5*	1:1	600	90	19,60	79,38
6*	1:2	600	90	22,76	80,49
7*	1:1	800	90	21,54	81,05
8*	1:2	800	90	23,76	77,72
PC	1:1,5	700	80	21,31	83,27
PC	1:1,5	700	80	21,29	77,16
PC	1:1,5	700	80	21,47	82,71

Tabela 5. Análise de variância dos fatores para a proteína do FAD enriquecido com sangue bovino.

	Quadrado médio	Teste F	Nível de significância
Diluição:D	18,81	31,06	0,0001
Vazão:V	2,91	4,81	0,045
Temperatura:T	3,99	6,59	0,022
DV	0,44	0,74	0,40
DT	1,53	2,53	0,13
VT	0,0014	0,00	0,96
Blocos	0,18	0,30	0,59
R=0,875			

trabalho (Figura 4). Observa-se através dos valores situados nos vértices que as melhores condições, com maior teor de proteína, encontram-se nos níveis de maior vazão, menor diluição e menor temperatura.

RENDIMENTO DAS AMOSTRAS DE FAD ENRIQUECIDO COM SANGUE BOVINO

Foi realizada análise de variância dos valores de rendimento das amostras de FAD enriquecido com sangue bovino através do software STATGRAPHICS PLUS 2.1 for Windows, apresentada na Tabela 6.

Pode-se observar na Tabela 6, que apenas a variável temperatura e a interação entre a diluição e a temperatura se mostraram significantes ao nível de 95% (valores menores que 0,05), sendo as outras interações e fatores principais não

significantes neste mesmo nível. A análise não sofreu interferências das amostras utilizadas, pois não houve significância dos blocos.

O gráfico dos efeitos principais sobre o rendimento, apresentado na Figura 5, mostra que a temperatura influencia a resposta negativamente, ou seja, quando trabalha-se em temperaturas mais altas, tem-se uma diminuição do rendimento em massa para o processo de enriquecimento protéico. A diluição e a vazão não apresentaram-se significantes sobre a resposta no nível estudado.

Através da figura 06 pode-se observar como a interação entre a temperatura e a diluição influenciou a resposta de rendimento do FAD enriquecido com sangue bovino, no gráfico dos efeitos conjugados.

Observando-se os efeitos conjugados ou interações, na Figura 6, nota-se que a única interação significativa, diluição e

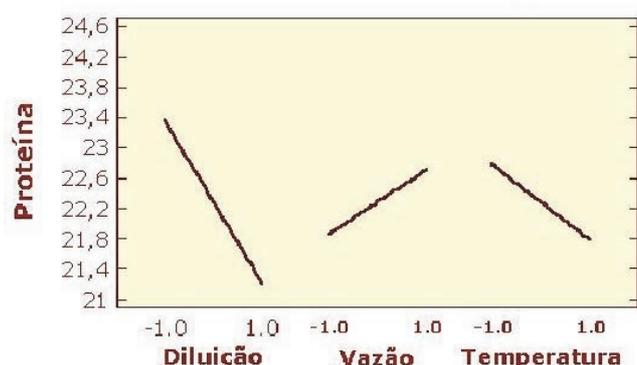


Figura 3. Gráfico dos efeitos principais para a proteína do farelo de arroz desengordurado enriquecido com sangue bovino.

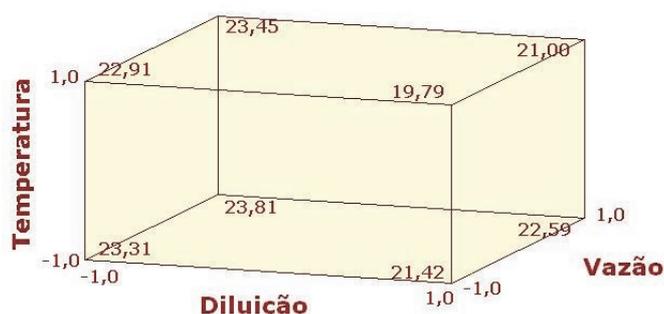


Figura 4. Cubo de resposta para a proteína do farelo de arroz desengordurado enriquecido com sangue bovino.

Tabela 6. Análise de variância dos fatores para o rendimento do FAD enriquecido com sangue bovino.

	Quadrado médio	Teste F	Nível de significância
Diluição:D	0,077	0,02	0,89
Vazão:V	9,31	2,17	0,16
Temperatura:T	33,95	7,90	0,013
DV	0,0000062	0,00	0,99
DT	19,69	4,58	0,048
VT	2,78	0,65	0,43
Blocos	5,04	1,17	0,29
R=0,735			

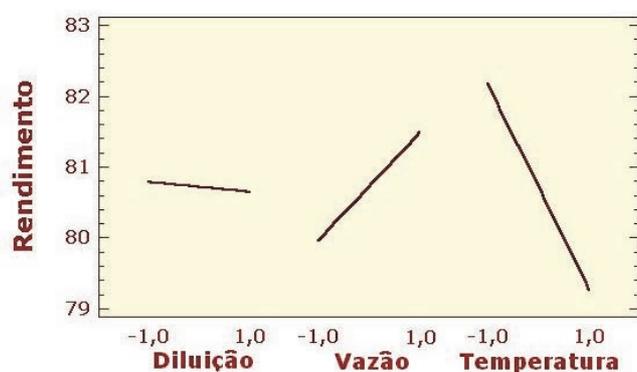


Figura 5. Gráfico dos efeitos principais para o rendimento do FAD enriquecido com sangue bovino.

temperatura, se comporta de modo que na menor temperatura, com o aumento da diluição tem-se um aumento no rendimento, e na maior temperatura tem-se uma diminuição do rendimento com o aumento da diluição.

Utilizando o cubo de resposta para o rendimento do FAD enriquecido com sangue bovino (Figura 7) com a finalidade de determinar a região de trabalho, observa-se que os valores encontrados se mostraram todos próximos de 80%, sendo a

melhor condição (maior valor de rendimento) obtida na maior vazão, maior diluição e menor temperatura.

CONCLUSÕES

A operação de enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado com sangue bovino em leite de jorro, foi caracterizada pela determinação das curvas fluidodinâmicas nas temperaturas de operação do experimento.

As matérias primas utilizadas no trabalho foram caracterizadas física e quimicamente, obtendo-se para o Farelo de Arroz Desengordurado e para o sangue bovino resultados compatíveis com dados relatados em bibliografia da área.

Para a análise estatística da resposta proteína bruta e rendimento em massa para o Farelo de Arroz Desengordurado enriquecido com sangue bovino, utilizou-se um planejamento experimental completo (2³), com ponto central, com três fatores: a diluição – sangue/água (1/1 e 2/1), a vazão de alimentação de sangue (600 e 800mL/h) e a temperatura (70°C e 90°). Sendo, os fatores significantes na análise estatística, ao nível de 95%, para a resposta proteína, e especificamente significantes a temperatura e a interação entre diluição e temperatura para a resposta de rendimento em massa.

O maior valor obtido para a proteína bruta do Farelo de Arroz Desengordurado enriquecido com sangue bovino foi

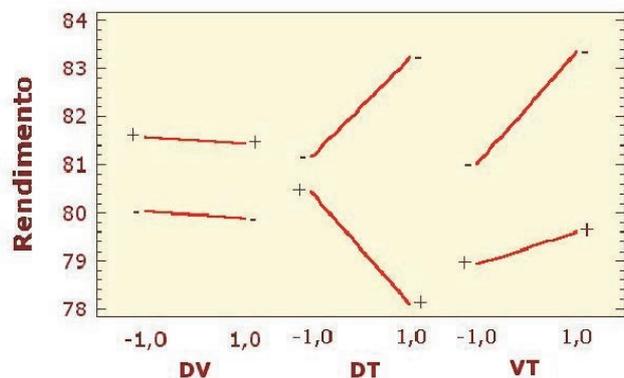


Figura 6. Gráfico dos efeitos conjugados para o rendimento do FAD enriquecido com sangue bovino.

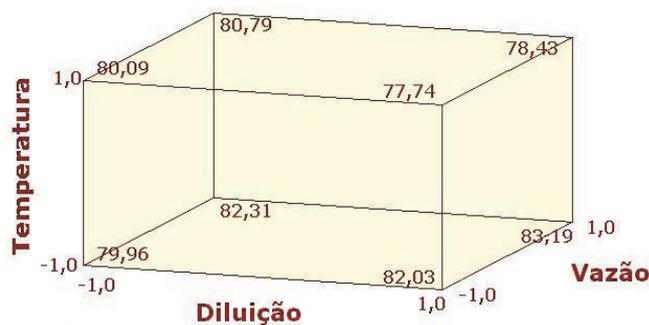


Figura 7. Cubo de reposta para o rendimento do FAD enriquecido com sangue bovino.

RIALA6/921

Massaro, A. F.; Pinto, L. A. de A.. Proteinic improvement of defatted rice bran, with bovine blood, using the spouted bed technique. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(2):77-84, 2002.

ABSTRACT. The objective of this work was to obtain the proteinic improvement of defatted rice bran by the coating and adsorption of bovine blood, in spouted bed, obtaining a final product with proteinic content of 25%, destined to animal food. The raw material was defatted rice bran and bovine blood. The proteinic improvement process was developed in a conic spouted bed, with tempered glass cell, and 22 cm of diameter and capacity to 860 g of bran. The experiments were organized in a matrix using the methodology of the complete factorial experimental design (2^3) with three factors in two variation levels and a central point: dilution – blood/water (1/1, 1,5/1, 2/1), feeding flow of the solution (600, 700 e 800mL/h) e temperature (70, 80 e 90°C), having like answers the protein and the efficiency. The best answers obtained in the enriched final product with dilution – blood/water (1/1), feeding flow of the solution (800mL/h) e temperature (70°C) were: protein (23,81%), efficiency (82,31%)

KEY WORDS. Proteinic improvement, Rice bran, Animal food.

encontrado na região de maior vazão de alimentação de sangue (800ml/h), menor diluição – sangue/água (1/1) e menor temperatura (70°C).

O maior valor obtido para o rendimento em massa do Farelo de Arroz Desengordurado enriquecido com sangue bovino foi encontrado na região de maior vazão de alimentação de sangue (800mL/h), maior diluição – sangue/água (2/1) e menor temperatura (70°C). Devido à proximidade dos valores de rendimento encontrados na faixa de diluição estudada, pode-se optar por trabalhar com a menor diluição (1/1), sacrificando-se em 1,1% o rendimento, mas agregando-se 5,4% em proteína ao valor do produto final. Desta forma tem-se como a melhor faixa de trabalho as condições obtidas para uma maior resposta em proteína, ou seja, 23,81% e um rendimento de 82,31%.

REFERÊNCIAS

- Pinto, L.A.A. *Compêndio de Análises Laboratoriais. Método Macro Kjeldahl para determinação de proteínas da A.O.A.C. (1990)*. Determinação de Proteínas nº 979.09. Rio Grande, RS; 2001. p. 18.
- Bittencourt, C. R.; Badiale-Furlong, E. *Recuperação das proteínas do sangue bovino*. Rio Grande, RS, 1996. [Trabalho de Iniciação científica – Fundação Universidade do Rio Grande].
- Bedin, D.M. *Revalorização do sangue de abate através de novos processos e novos produtos*. Campinas, SP, 1987. [Dissertação de Mestrado FEA - UNICAMP].
- Borderías, A. J.; Monteiro, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas em alimentos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 28(2):159–69, 1998.
- Brião, E. B. et al. *Enriquecimento de farelo de arroz com sangue bovino, utilizando a técnica de leito de jorro*. Rio Grande, RS, 1998. [Projeto de graduação em Engenharia Química - Fundação Universidade do Rio Grande].

6. Costa, C.; França, V. Alternativas alimentares: soluções nutritivas baratas e regionais para combater a fome. **Pólis**, 8: 27-32, 1993.
7. Dadalt, G. M. et al. **Avaliação Química e Nutricional de Farelos de Arroz Integrais**. Rio Grande, RS, 1997. [Trabalho de Iniciação científica - Fundação Universidade do Rio Grande]
8. Dill, C. W.; Landmann, W. A. Food grade proteins from edible blood. In: Pearson, Domene. Utilização do sangue bovino para alimentação humana. **Nutrição** 1(2): 163-79, 1988.
9. Freire, J. T.; Oliveira, W. P. In: Freire, J. T.; Sartori, D. J. M. **Tópicos especiais em secagem**. São Carlos, SP: São Carlos, 1992. 72 p.
10. Goulart, G. A. S; Almeida, A. R. F.; Pinheiro, V. F. **Utilização do leite de jorro na secagem do plasma bovino**. Rio Grande, RS, 1999. [Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande].
11. Kirkhofel, B. H. S. et al. **Processo de Parboilização de Arroz, uso alternativo do leite de jorro**. Rio Grande, RS, 1999. [Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Fundação Universidade do Rio Grande].
12. Ockermann, H. W.; Hansen, C. L. **Industrialización de Subproductos de origem animal**. Saragoza: Acribia, 1994. 236 p.
13. Prates, E. R. Farelo de arroz e resíduos da limpeza de arroz na alimentação de ruminantes. **Revista de Zootecnia**, 10: 23-9, 1994.
14. Rocha, S. C. S. Recobrimento de Comprimidos. In: Freire, Sartori. **Tópicos especiais em secagem** São Carlos, SP: São Carlos, 1992. p. 34-40.
15. Salcedo, A. M. **Potencial do plasma bovino adsorvido em farelo de arroz para uso em formulação de sobremesa**. Rio Grande. RS, 1997. [Projeto de graduação em Engenharia de Alimentos – Fundação Universidade do Rio Grande]
16. Sgarbieri, W. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo, SP: Varela, 1996. 517 p.

Recebido em 06/09/2001 ; Aprovado em 01/10/2002

Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. I. Doces de frutas em pasta

Standardization of method and quantification of the extraneous materials and mycelial of molds. I. Fruit pastes in sweets

Marlene CORREIA¹
Maria José RONCADA²

RIALA6/922

Correia, M.; Roncada, M.J. Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. I. Doces de frutas em pasta. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):85-90, 2002

RESUMO. Com objetivos de padronizar procedimentos analíticos e avaliar a contaminação por matérias estranhas e filamentos micelianos de fungos em doces de frutas em pasta industrializados (bananada, goiabada e marmelada), foram colhidas 57 amostras dos doces citados em supermercados da cidade de São Paulo. Os métodos utilizados para determinação dos parâmetros estudados mostraram-se adequados. Quanto aos resultados das análises, 54,4% das amostras apresentaram matérias estranhas (principalmente fragmentos de insetos); 80,7% continham filamentos micelianos pela contagem Howard e 31,6% estavam positivas para hifas de *Geotrichum*. Considerando a legislação de alimentos em vigor, 83,0% das amostras de doces em pasta estavam positivas em pelo menos uma das três determinações, podendo concluir que os produtos analisados apresentaram alto índice de contaminação, tendo como principal fator a presença de filamentos micelianos.

PALAVRAS-CHAVE: Metodologia; doces em pasta; análise microscópica; matérias estranhas; filamentos micelianos; fungos

INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios, principalmente de origem vegetal, nem sempre estão isentos de matérias estranhas como fragmentos de insetos, insetos adultos e suas fases intermediárias, ácaros e pêlos de animais.

Os insetos e os ácaros, além de depositarem suas dejeções sobre os alimentos, causando doenças por fungos, bactérias, vírus, protozoários e helmintos^{6,15,8}, também podem contaminar os produtos com microrganismos que se

encontram aderidos ao seu corpo e pernas^{18,19,5,4}. Além disso, os ácaros podem desencadear processos alérgicos em indivíduos susceptíveis, quando ingeridos com alimentos^{9,2,12,10}.

Entre os insetos, as moscas exercem papel importante na contaminação de alimentos e são potencialmente prejudiciais à saúde humana, por serem vetores passivos de patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, como *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholera*^{11,13}.

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

² Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Os insetos, ao atacarem o alimento, facilitam a entrada de bactérias e fungos e de invasores secundários, como outros insetos e ácaros. Roedores e pássaros, como primeiro nível de consumidores, além de se alimentarem do produto, os contaminam com excrementos, pêlos e penas, propiciando o aparecimento de consumidores de terceiro nível, como outros insetos e ácaros micófitos. Também os excrementos dos consumidores de primeiro nível são utilizados como substrato para o crescimento microbiano e como alimento para alguns consumidores de segundo e terceiro níveis¹⁴.

As frutas mantidas em caixas ou outros espaços confinados formam um microclima favorável ao desenvolvimento dos fungos que podem estar presentes na lesão causada pela colheita ou pelo manuseio inadequado. O extravasamento de líquidos tissulares da fruta facilita a germinação de esporos e, mesmo que os fungos não se desenvolvam o suficiente para produzir a doença na fruta, na industrialização, após o processamento, podem deteriorar o produto¹⁶.

Apesar dos fungos serem inativados na etapa de processamento térmico, durante a industrialização e, portanto, com resultados negativos nas culturas microbiológicas, suas estruturas (hifas) permanecem no produto, freqüentemente de forma fragmentada, indicando que foi utilizada matéria-prima contaminada com esses organismos ou condições inadequadas de higiene durante o processamento¹⁷.

Entre os fungos que podem contaminar os alimentos encontra-se o *Geotrichum candidum* Link, presente no solo e em frutas e hortaliças em decomposição. No campo, seus esporos e fragmentos de micélio são transportados pela mosca-da-fruta que, assim, contamina vegetais sãos, causando, entre outros, a podridão ácida em frutas cítricas e tomates. Esse fungo apresenta como característica o desenvolvimento e aderência do micélio à superfície de equipamentos e utensílios utilizados no processamento dos vegetais, como madeira, metal, borracha e aço inoxidável; em contato com o alimento, esse micélio se desprende, causando contaminação do produto final⁷.

Segundo a legislação de alimentos em vigor³, em relação aos parâmetros microscópicos, os doces em pasta não podem apresentar sujidades, partes de insetos, fungos, detritos orgânicos ou substâncias que indiquem a utilização de ingredientes em condições insatisfatórias ou tecnologia de processamento inadequada.

Como a "Association of Official Analytical Chemists International" (AOAC International)¹ estabelece métodos para a determinação de matérias estranhas em geléias e gelatinas mas não para doces de fruta em pasta, e métodos para contagem Howard em néctar, purê, geléia e doce em pasta de diversas frutas mas não para banana e marmelo, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de padronizar procedimentos analíticos para matérias estranhas e filamentos micelianos em bananada, goiabada e marmelada e de verificar o nível de contaminação desses doces industrializados e comercializados em supermercados da Cidade de São Paulo, quanto aos dois parâmetros citados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem

Para a padronização do método Howard para contagem de filamentos micelianos em doces de frutas em pasta foram colhidas, em supermercados da cidade de São Paulo, 12 amostras-teste, sendo 4 de bananada, 4 de goiabada e 4 de marmelada, além de 4 amostras-teste de cada tipo de geléia das frutas que apresentam diluição padronizada na metodologia da AOAC (goiaba, amora, framboesa e morango).

Para verificar as condições higiênicas dos doces em pasta industrializados, foram realizadas 3 colheitas de amostras de mesma marca e com números de lote/datas de fabricação e/ou validade diferentes em cada colheita, de todas as marcas comercializadas nos principais supermercados da cidade de São Paulo, no período de abril/1998 a janeiro/1999. Como o número de indústrias fabricantes foi diferente para cada tipo de doce, das 57 amostras colhidas, 6 foram de bananada, 36 de goiabada e 15 de marmelada (respectivamente, 2, 12 e 5 marcas).

2. Métodos

Matérias estranhas

O método 16.10.06/950.89a da AOAC¹ para determinação de matérias estranhas (sujidades) em geléias de frutas, foi utilizado para a análise das amostras de doces de frutas em pasta, com a seguinte adaptação de metodologia: pesar 100 g de amostra em frasco armadilha, adicionar 200 mL de água filtrada a 50°C e aquecer em banho-maria até dispersão do material (Figura 1).

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

Contagem Howard

No método 16.18.05/982.33AdB (AOAC)¹ para contagem Howard de filamentos micelianos em produtos de frutas, o sedimento obtido na etapa de centrifugação deve ser diluído com solução a 0,5% de carboximetilcelulose. Como o método não estabelece a diluição que deve ser usada para produtos de banana e de marmelo, foi adotado como parâmetro o teor de sólidos solúveis da amostra ou grau Brix (°Brix), medido em refratômetro, baseando-se nos valores de °Brix obtidos após as diluições dos sedimentos resultantes de frutas descritas no método, ou seja: goiaba (1+3); amora, framboesa e morango (1+6), para o que foram utilizadas amostras de geléias.

Foram testadas diferentes diluições com solução a 5% de carboximetilcelulose do sedimento das amostras de bananada, goiabada e marmelada, para a obtenção de valores de °Brix em intervalo semelhante àquele das frutas padronizadas no método citado. Também foi padronizada a alíquota da amostra, utilizando-se 50 g.

O preparo das lâminas e a contagem foram realizados segundo o método 16.17.01/984.29ABC da AOAC¹. Para cada

Determinação de matérias estranhas

Retirar pedaços de diferentes partes da amostra e pesar 100 g em frasco armadilha de 1000 mL. Adicionar 200 mL de água filtrada a 50°C e aquecer, em banho-maria, até dispersar a amostra, mexendo 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.

Contagem Howard para filamentos micelianos

Retirar pedaços de diferentes partes da amostra e pesar 50 g, em béquer de 400 mL. Adicionar 150 g de água filtrada e mexer com espátula para dispersar a amostra. Misturar bem o material do béquer e transferir 40 mL para tubo cônico de centrífuga graduado, de 50 mL. 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 na proporção 1+4 (v/v).

Contagem de filamentos micelianos de *Geotrichum*

Misturar bem o material do béquer, transferir 40 mL para tubo cônico de centrífuga graduado, de 50 mL, adicionar 10 gotas de solução de cristal violeta e misturar bem. 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.

Figura 1. Métodos empregados na análise de doces de frutas em pasta

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 57 amostras comerciais para avaliar a contaminação por filamentos micelianos foi utilizada a diluição 1+4 proposta neste estudo (Figura 1).

Contagem de *Geotrichum*

As amostras de doces de frutas em pasta foram preparadas segundo o procedimento 16.19.13/982.34AdB (AOAC)¹, em duplicata, com 50 g cada (Figura 1). 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 (AOAC)¹.

Para cada amostra, em duplicata, foram preparadas 2 lâminas 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)¹.

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/SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Matérias estranhas

O método de determinação de matérias estranhas em geléias de frutas mostrou-se adequado para os doces de frutas em pasta, com introdução da etapa de dispersão a quente da amostra, resultando em uma extração das matérias estranhas com poucos elementos histológicos dos vegetais, que não interferiram na identificação e contagem das matérias estranhas presentes nos papéis de filtro.

Apresentaram matérias estranhas 31 amostras (54,4%), sendo 1 (16,7%) de bananada, 27 (75,0%) de goiabada e 3 (20,0%) de marmelada.

Tabela 1. Número e percentual de amostras de doces de frutas em pasta, por tipos de matérias estranhas

Tipos	Matérias estranhas Intervalos	Amostras de doces de frutas em pasta					
		Bananada		Goiabada		Marmelada	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Inseto	1-5	0	0,0	1	2,8	0	0,0
Larva	1-5	0	0,0	4	11,1	0	0,0
Exuvia	1-5	0	0,0	5	13,9	1	2,8
Ovo	1-5	0	0,0	9	25,0	0	0,0
Fragmento de inseto	1-5	0	0,0	19	52,8	1	2,8
	6-10	0	0,0	3	8,3	1	2,8
	11-20	0	0,0	1	2,8	0	0,0
Ácaro	1-5	1	2,8	8	22,2	1	2,8
Pêlo de roedor	1-5	0	0,0	1	2,8	0	0,0
Total		6		36		15	

Tabela 2. Diluição e °Brix das amostras-teste de doces de frutas em pasta e geléias.

Tipos de doces	Nº de amostras	Diluição	°Brix *
Goiabada	4	1+4	4,0
Bananada	4	1+4	3,8
Marmelada	4	1+4	3,7
Geléia de amora	4	1+6	3,3
Geléia de framboesa	4	1+6	3,3
Geléia de goiaba	4	1+3	4,0
Geléia de morango	4	1+6	3,4

*Média dos valores obtidos das 4 amostras-teste

Fragments de insetos e ácaros foram os contaminantes encontrados em maior percentual de amostras, enquanto pêlo de roedor foi isolado de 1 amostra de goiabada (Tabela 1). Uma amostra (goiabada) apresentou simultaneamente 4 dos 7 tipos de matérias estranhas isolados.

Os ácaros isolados das amostras de bananada e de marmelada foram identificados como pertencentes à Ordem Acariforme: Família Oribatidae; na goiabada, além destes, foram identificados ácaros da Ordem Parasitiforme: Família Ascidae.

Contagem Howard para filamentos micelianos

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos ensaios para padronização da diluição das amostras-teste de doces de frutas em pasta (representam a média dos valores obtidos nas 4 amostras-teste de cada tipo de doce de fruta em pasta) e das geléias utilizadas como padrão.

Como as amostras-teste de geléias de amora, framboesa, goiaba e morango, após a diluição do sedimento, apresentaram valores de °Brix entre 3,3 e 4,0, adotou-se esse intervalo de °Brix a ser usado para as amostras de bananada, goiabada e marmelada. Assim, empregando-se diluição 1+4 para os doces em pasta, resultaram valores de °Brix entre 3,7 e 4,0 e, portanto, em intervalo semelhante àquele obtido para as amostras-teste

de geléias.

A distribuição dos percentuais de filamentos micelianos dos três tipos de doces de frutas em pasta (Tabela 3), mostraram existir uma maior contaminação nas goiabadas, com 100% das amostras apresentando fungos (valor mínimo 9,0% e máximo 96,0% de campos positivos). Para marmelada, 53,3% apresentaram hifas de fungos com máximo de 35,0% de campos positivos. Em relação às bananadas, foi obtido o maior percentual (66,6%) de amostras isentas de filamentos de fungos e, nos positivos, o valor máximo de 12,0% de campos.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores²⁰ que, embora tenham utilizado diluição da amostra diferente da adotada neste estudo, encontraram amostras de goiabada contendo até 100% de campos positivos para filamentos micelianos e de marmelada com até 30% de campos positivos.

Contagem de *Geotrichum*

Assim como verificado nas análises de matérias estranhas e de contagem Howard, as goiabadas apresentaram os maiores percentuais de contaminação (Tabela 4), com 41,7% das amostras contendo hifas de *Geotrichum*, com valor máximo de 2.300 filamentos/100 mL de preparação, sugerindo uma precária

Tabela 3. Números e percentuais de amostras por tipos de doces de frutas em pasta, quanto à contagem Howard para filamentos micelianos.

Percentual de campos positivos	Banana		Goiabada		Marmelada	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0	4	66,6	0	0,0	7	46,7
1—10	1	16,7	1	2,8	5	33,3
11—20	1	16,7	2	5,5	0	0,0
21—30	0	0,0	4	11,1	2	13,3
31—40	0	0,0	3	8,4	1	6,7
41—50	0	0,0	4	11,1	0	0,0
51—60	0	0,0	2	5,5	0	0,0
61—70	0	0,0	7	19,4	0	0,0
71—80	0	0,0	6	16,7	0	0,0
81—90	0	0,0	4	11,1	0	0,0
91—100	0	0,0	3	8,4	0	0,0
Total	6	100,0	36	100,0	15	100,0

Tabela 4. Números e percentuais de amostras por tipos de doces de frutas em pasta, quanto à contagem de filamentos micelianos de *Geotrichum*.

Nº de filamentos micelianos	Banana		Goiabada		Marmelada	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0	6	100,0	21	58,3	12	80,0
1—500	0	0,0	0	0,0	0	0,0
501—1000	0	0,0	5	13,9	2	13,3
1001—1500	0	0,0	5	13,9	1	6,7
1501—2000	0	0,0	3	8,3	0	0,0
2001—2500	0	0,0	2	5,6	0	0,0
Total	6	100,0	36	100,0	15	100,0

seleção das frutas “in natura” ou utilização de matéria-prima em condições higiênicas insatisfatórias. Em nenhuma amostra de banana foi encontrada hifa desse fungo.

Contagens de até 30.000 filamentos de *Geotrichum* em amostras de marmeladas, 60.000 em bananas e 80.000 em goiabadas foram obtidas por outro autor²¹, em estudo realizado com esses doces, de marcas comercializadas em São Paulo, concluindo que a utilização de procedimentos de boas práticas de fabricação como, por exemplo, rigorosa inspeção de equipamentos e utensílios utilizados na elaboração desses doces evitaria ou, pelo menos, diminuiria a contaminação.

CONCLUSÕES

- A adaptação do método para determinação de matérias estranhas em doces de frutas em pasta foi adequada.
- A padronização da diluição da amostra para o método Howard nos produtos cujas frutas não tinham

diluição estabelecida (banana e marmelo), permitiu a contagem de filamentos de fungos em doces em pasta dessas frutas.

- Dos três tipos de doces de frutas em pasta analisados, a goiabada foi o que apresentou maior número de amostras contaminadas, percentuais mais altos de contaminação e maior diversidade de matérias estranhas (4 tipos).
- Os doces de frutas em pasta apresentaram como principal contaminante os filamentos de fungos, determinado pelo método Howard, seguido pelas matérias estranhas, em percentual significativo de amostras (principalmente fragmentos de insetos).
- O percentual de amostras de doces de frutas em pasta com resultados positivos em pelo menos uma das três determinações (matérias estranhas, contagem Howard e contagem de *Geotrichum*) foi de 83%, índice que pode ser considerado alto e tendo como principal fator a presença de filamentos micelianos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido.

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

RIALA6/922

Correia, M.; Roncada, M.J. Standardization of method and quantification of the extraneous materials and mycelial of molds. I. Fruit pastes in sweets. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(2):85-90, 2002

ABSTRACT. In order to standardize analytical procedures and to evaluate the contamination for extraneous materials and mycelial of molds in industrialized fruits pastes in sweets (banana sweet paste, guava sweet paste and quince sweet paste), 57 samples of such sweet products were gathered in supermarkets from São Paulo city, Brazil. The methods used for determination of the cited parameters revealed adequate. In relation to the results of the analyses, 54.4% of the samples presented extraneous materials (mainly insects fragments); 80,7% contained mycelial fragments for the Howard mold counting and 31.6% were positive for mycelial fragments of *Geotrichum* mold. Considering the food legislation in force, 83.0% of the fruit pastes in sweets were positive in at least one of the three determination, we can conclude that the analyzed products presented high index of contamination, having as main factor the presence of mycelial fragments.

KEY WORDS: Metodology; fruit pastes; microscopic analysis; extraneous materials; mycelial fragments; molds

REFERÊNCIAS

1. AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. Gaithersburg, U.S.A. Cap. 16. (1 CD-ROM), 2000.
2. Blanco, C. et al. Anaphylaxis after ingestion of wheat flour contaminated with mites. *J. Allergy Clinical Immunology*, 99: 308-313, 1997.
3. Brasil, 1978. Resolução Normativa n° 09, de outubro de 1978. Atualiza a Resolução n° 52/77 da CNNPA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 19.825-7, 11 dez. Seção I, pt. 1.
4. Fehlhaber, K.; Janetschke, P. **Higiene veterinaria de los alimentos**. Zaragoza: Acribia; 1992, p. 57-83.
5. Gorhan, J. R. Filth in foods: implications for health. In: Gorhan, J.R., editor. **Principles of food analysis for filth, decomposition and foreign matter**, 3rd ed. Washington (DC): FDA; 1993. p. 27-32. (FDA Technical Bulletin n° 1).
6. Gorhan, J. R. The significance for human health of insects in food. **Annual Review Entomology**, 24: 209-24, 1979.
7. Jay, J. M.. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3^a ed. Zaragoza: Acribia; 1994, 221-233.
8. Larkin, E. P. Food contaminants - viruses. **Journal of Food Protection**, 44: 320-25, 1981
9. Matsumoto, T. et al. Systemic anaphylaxis after eating storage-mite-contaminated food. **Internationat Archivies Allergy Immunology**, 109: 197-200, 1996.
10. Olsen, A. R. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. II. Alergenic mites: an emerging food safety issue. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, 28: 190-198, 1998a.
11. 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, 1998b.
12. Sanchez-Borges, M. Mite-contaminated food as a cause of anaphylaxis. **J. Allergy Clinical Immunology**, 99: 738-743, 1997.
13. Schuller, L. As moscas domésticas e sua importância na transmissão de intoxicações e infecções alimentares. **Higiene Alimentar**, 14: 28-38, 2000.
14. Sinha, R. N. Storage ecosystems. In: Gorhan, J.R., editor. **Ecology and management of food-industry pests**. Ed. Arlington: AOAC; 1991. p. 17-30. (FDA Technical Bulletin n° 4).
15. Stasny, J. T.; Albright, F.R.; Graham, R. Identification of foreign matter in foods. **Scanning Electron Microscopy**, 3:599-610, 1981.
16. Taylor, R. B. Introducción al procesado de las frutas. In: Artley, D.; Ashurst, P. R, editor. **Procesado de frutas**. Zaragoza: Acribia; 1997, p. 1-19.
17. Yokoya, F. Método Howard para contagem de fungos em produtos industrializados. Campinas: UNICAMP. 1993, 12 p.
18. Vasquez, A. W. Recognition of insect fragments. In: Gorhan, J. R, editor. **Training manual for analytical entomology in the food industry**. Washington (DC): FDA; 1977. p. 48-52. (FDA Technical Bulletin 2),.
19. Vasquez, A. W. Hair structure and identification. 1977b. In: Gorhan, J. R, editor. **Training manual for analytical entomology in the food industry**. Washington (DC): FDA; 1977. p. 70-5. (FDA Technical Bulletin 2).
20. Zamboni, C. Q.; Alves, H. I.; Santos, M.C. Contagem de filamentos micelianos em doces em pasta de goiaba, marmelo, pêssego e figo, pelo método de Howard. **Rev Inst. Adolfo Lutz**, 41: 31-55, 1981.
21. Zamboni, C. Q. **Utilização do fungo *Geotrichum candidum* no controle da industrialização de produtos de frutas**. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 1986, 176 p.

Recebido em 23/09/2002 ; Aprovado em 05/12/2002

Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*.

Strategies for identification of the *Mycobacterium fortuitum* complex species

Roberta M. BLANCO¹
Vânia T. G. INUMARU¹
Maria Conceição MARTINS^{1*}
Carmen M.S. GIAMPAGLIA¹
Suely Y.M. UEKI¹
Erica CHIMARA¹
Júlia T.U. YOSHIDA¹
Maria Alice S. TELLES¹

RIALA6/923

Blanco, R. M. et al. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 61(2):91-96, 2002

RESUMO. As micobactérias de crescimento rápido anteriormente classificadas como complexo *Mycobacterium fortuitum* foram recentemente designadas *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. A identificação dessas micobactérias é importante para estabelecer a terapêutica adequada, visto que possuem diferentes padrões de resistência às drogas. Dentre 3.441 culturas de micobactérias recebidas em 1999 no Setor de micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, foram selecionadas 13 cepas, classificadas como complexo *M. fortuitum*. O estudo incluiu o isolamento das colônias para certificar-se da pureza das culturas, a adição de testes com carboidratos e citrato de sódio que separam as quatro espécies citadas e o uso da técnica de PCR restriction analysis do gene *hsp65* (PRA) para elucidação de resultados duvidosos dos testes fenotípicos. Na análise das 13 culturas, observou-se que oito apresentaram dois tipos de colônias (lisa e rugosa) e as cinco restantes apenas um tipo. As identificações feitas com a técnica de PRA e com os testes fenotípicos foram concordantes na maioria das cepas. Os resultados desse estudo sugerem que a identificação de micobactérias devido a sua complexidade deva ser centralizada em laboratórios de referência e implementada com testes específicos para cada espécie, que possibilitem a elucidação rápida do diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycobacterium fortuitum*, Identificação fenotípica, PCR.

¹ Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

* Endereço para correspondência – Setor de Micobactérias/Seção de Bacteriologia,
Av. Dr Arnaldo nº 351- 9º andar, Cerqueira César, cep 01246-902, São Paulo-SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido geralmente estão associadas às espécies anteriormente designadas complexo *M. fortuitum*, que incluíam *M. fortuitum*, subespécies *M. fortuitum* e *M. peregrinum* e *M. chelonae* subespécies *M. chelonae* e *M. abscessus*¹⁵. Essa designação foi usada até meados da década de 1980, pela maioria dos laboratórios clínicos para informar o resultado das culturas. Em 1981, Silcox et al.¹² descreveram provas para a identificação das espécies *M. fortuitum* e *M. chelonae* incluindo as subespécies, pois observaram que nos Estados Unidos um número elevado dessas micobactérias estava sendo notificado ao Center for Disease Control and Prevention. Em 1992, Kusunoki e Ezaki⁶ propuseram que *M. peregrinum* e *M. abscessus* fossem nomeadas novas espécies por possuírem características individuais que as diferenciavam de *M. fortuitum* e *M. chelonae*. Na nomenclatura bacteriana atual constam as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*³, definidas com base em testes genotípicos que permitem a caracterização precisa do micorganismo^{2,6,10,13}. A identificação das espécies é importante para a conduta terapêutica adequada, pois cepas isoladas de casos relacionados com doença apresentam diferenças no padrão de susceptibilidade às drogas^{4,12,17}.

Essas micobactérias são ambientais mas patógenos oportunistas^{1,4,15}, é comum a sua presença no solo, na água (rios, lagos e água tratada) e portanto podem ser contaminantes de equipamentos médicos, broncoscópicos, soluções para assepsia e materiais usados em cirurgia^{9,11,16}.

As doenças causadas por essas espécies incluem as formas pulmonares, disseminadas, endocardite, feridas cirúrgicas e traumáticas, doenças de pele e de tecidos^{4,16}.

No Brasil, um relato de caso de ceratite por *M. chelonae* após cirurgia para correção de miopia¹¹, um resumo sobre infecções cutâneas por *M. abscessus* e *M. fortuitum* após aplicações em mesoterapia ou cirurgia plástica⁹ e um artigo de LEÃO⁷ sobre o risco crescente de infecções por essas espécies de micobactérias, em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, indicam a necessidade de respaldo laboratorial para o diagnóstico desses casos.

No Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (IAL) São Paulo, os testes fenotípicos usados até a presente data identificavam *M. fortuitum* e *M. chelonae* e quando não era possível a definição dessas espécie, informava-se como complexo *M. fortuitum*.

O objetivo deste estudo foi reavaliar as cepas de 1.999 classificadas como complexo *M. fortuitum*, identificar as espécies acima citadas adicionando novos testes fenotípicos e usar a técnica de PCR restriction analysis do gene *hsp65* (PRA) para elucidação de resultados duvidosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Dentre 3.441 culturas de micobactérias recebidas em 1999 no Setor de Micobactérias do IAL foram identificadas 32 *M.*

fortuitum, 23 *M. chelonae* e 13 classificadas como complexo *M. fortuitum* que foram selecionadas para estudo. Para a identificação foram usadas 25 provas fenotípicas citadas na literatura internacional^{1,5,8,14,15}. O *M. fortuitum* é nitrato positivo, ofloxacina negativo e galactosidade negativo e o *M. chelonae* é nitrato negativo, ofloxacina positivo e galactosidase positivo. As cepas classificadas como complexo *M. fortuitum* tinham o perfil variável com referência a essas provas não sendo possível a definição da espécie.

As culturas conservadas em meio Löwenstein Jensen (LJ) foram repicadas no mesmo meio e após o crescimento ressuspendidas em água destilada estéril na turvação da escala 1 de MacFarland e diluídas 1/1000. Foi feita a semeadura com alça, em placas com meio Middlebrook 7H11 para isolar as colônias e certificar-se da pureza das culturas que foram observadas com o auxílio de um estereoscópio para anotação das suas características. Em meio sólido as colônias dessas espécies podem ser lisas ou rugosas, algumas apresentando características bem definidas^{5,15}. Os diferentes tipos de colônia foram submetidos aos testes fenotípicos que constam na tabela 1. Os meios com açúcares (manitol, frutose e succinato) e citrato de sódio foram usados nesse estudo para auxiliar na diferenciação das quatro espécies^{1,5,8,14,15}.

As culturas com resultados discordantes nos testes com carboidratos e citrato de sódio foram submetidas à técnica de PCR-restriction enzyme analysis do gene *hsp65* (PRA)^{2,13}.

RESULTADOS

Na análise das 13 culturas observou-se oito com dois tipos de colônia (lisa e rugosa) e cinco com apenas um tipo. As culturas com dois tipos (16 isolamentos) foram identificadas com os testes fenotípicos como *M. fortuitum* (três) e *M. peregrinum* (cinco). As cinco culturas com um tipo de colônia foram identificadas como: duas *M. peregrinum* (rugosa), uma *M. fortuitum* (lisa), uma *M. chelonae* (lisa) e uma micobactéria de crescimento lento acromógena (lisa).

Alguns testes fenotípicos mais indicados para a identificação dessas espécies constam da tabela 1. Nesta observa-se os resultados esperados para cada espécie, os das culturas originais classificadas como complexo *M. fortuitum* (conforme registro do Setor) e os obtidos nos repiques após separação das colônias. Ocorreu mudança no resultado de uma ou mais provas em relação aos resultados da cultura original, apenas a cepa três e respectivo repique apresentaram o mesmo perfil. O teste que apresentou maior variação foi NaCl 5% e os menos variáveis foram Ácido pícrico e Ofloxacina. Dentre os repiques das cepas com dois tipos de colônia, observou-se em cada tipo de colônia variação de resultados em três testes, repique 4 (NaCl 5% e Arilsulfatase) e repique 5 (Ácido pícrico).

Nas provas com carboidratos e citrato de sódio observou-se variação de resultados nos dois repiques das cepas 3, 4 e 7 e perfis de resultados não específicos para essas espécies nos repiques das cepas 10 e 13. Esses oito isolamentos foram

Tabela 1 – Resultados da identificação fenotípica propostos na literatura para definição das espécies e o observado das 13 cepas (original e repiques) – Instituto Adolfo Lutz 1999

Cepas	Provas fenotípicas											Resultado
	A.pírico	NaNO ₂	NaCl 37°C	Ofloxacina	Aril 3 dias	Galactato	Nitrito	Succinato	Manitol	Frutose	Citrato de Sódio	
Padrão 1	-	-	-	+	+ ^V	+	-	-	-	-	+	M.che
Padrão 2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	M.abs
Padrão 3	+ ^V	+	+	-	+ ^V	-	+	+	-	+	-	M.fo
Padrão 4	+	Nc	+	-	+	-	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 1	+	+	-	-	+	-	-	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 1	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 2	+	-	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	M.fo
Cepa 3	+	+	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 3	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	-	M.pe
Cepa 4	+	+	-	-	-	-	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 4	+	+	V	-	V	-	+	+	V	+	-	M.pe
Cepa 5	+	+	+	-	-	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 5	V	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	M.fo
Cepa 6	+	+	+	-	+	-	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 6	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	M.fo
Cepa 7	-	+	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 7	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	V	M.pe
Cepa 8	+	+	+	-	-	+	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique8	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 9	+	+	+	+	+	+	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 9	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 10	-	+	-	+	+	-	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 10	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	CLA
Cepa 11	+	+	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 11	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	M.fo

M.Che-*M. chelonae*, M. abs- *M. abscessus*, M.fo- *M. fortuitum*, M. pe- *M. peregrinum*,
C.M.Fo- complexo *M. fortuitum*

Aril 3d- arilsulfatase 3 dias, galacto- â galactosidase
cepas de 1 a 8 – dois repiques (1 colônia rugosa, 1 colônia lisa)

cepas 9 a 13 – 1 repique (apenas um tipo de colônia)

V- resultado variável nos repiques (1 positivo, 1 negativo), N- não realizado Nc- não consta

Tabela 2 – Culturas submetidas a técnica de PRA para confirmação da espécie

Cultura	Número de isolamentos	Identificação fenotípica	Identificação pelo PRA
Repique 3	2	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum I</i>
Repique 4	2	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum II</i>
Repique 7	2	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum II</i>
Repique 10	1	Micobactéria de crescimento lento acromógena	<i>M. nonchromogenicum II</i>
Repique 13	1	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae I</i>

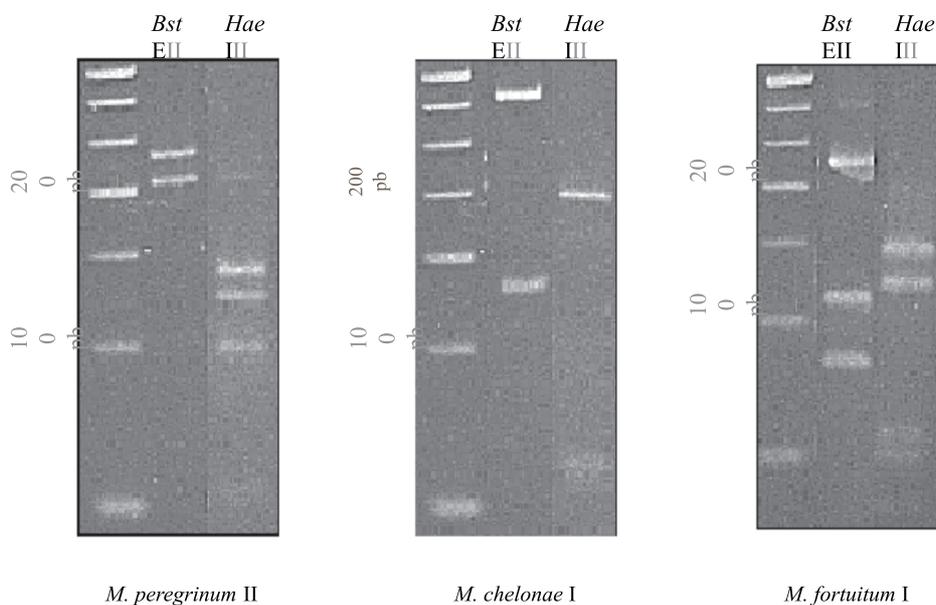


Figura 1. Padrões de PCR- restriction enzyme analysis obtidos na identificação das cepas do complexo *M. fortuitum*

submetidos ao PRA para elucidação dos resultados duvidosos. (tabela 2).

Os padrões de PRA para identificação das espécies *M. fortuitum I*, *M. chelonae I* e *M. peregrinum II* constam da figura 1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nossos resultados, conforme citam Yakrus et al¹⁷, mostram a dificuldade para diferenciar essas espécies de micobactérias apenas com testes fenotípicos e ressaltam a necessidade de que nos laboratórios de referência estejam disponíveis outros métodos para auxiliar nessa identificação.

A adição dos testes de utilização de açúcares e citrato de sódio possibilitou a diferenciação entre *M. fortuitum* e *M. peregrinum* que não era possível com os demais testes sugerindo que, de imediato, pode ser útil a utilização desses testes para a identificação de micobactérias de crescimento rápido.

Constatamos diferenças de resultados em alguns testes que podem ter sido induzidas por alterações nos meios de cultura, nas temperaturas de incubação ou nas suspensões bacterianas. Além das variações ocorridas devido a fatores inerentes aos procedimentos, sempre que são propostos testes fenotípicos para identificação de uma espécie nem todos os organismos pertencentes a ela expressam o mesmo resultado. Devido ao exposto podem ocorrer interpretações errôneas dos resultados de identificação ou não ser possível a diferenciação dessas espécies que têm perfis fenotípicos muito próximos.

Nesse estudo com as cepas do complexo *M. fortuitum* observou-se uma que após o repique foi classificada com os testes fenotípicos como micobactéria de crescimento lento acromógena (identificação não conclusiva) e pelo PRA foi identificada como *M. nonchromogenicum* e uma (dois repiques) identificada como *M. peregrinum* pelo fenotípico e como *M. fortuitum* pelo PRA. Ringuet et al¹⁰. em estudos de

sequenciamento com o gene *hsp65*, descreveram três cepas de *M. peregrinum* com características intermediárias entre essa espécie e *M. fortuitum* o que pode explicar a diferença observada nos resultados dos testes fenotípicos e PRA.

A comparação dos resultados dos testes fenotípicos e PRA não foi o objetivo desse estudo, mas existem relatos de que essa técnica é útil para elucidar resultados duvidosos e estabelecer as espécies de micobactérias. Devallois et al.² usando o PRA para o estudo de micobactérias já caracterizadas por outras técnicas, relataram a discriminação de algumas espécies que não foram diferenciadas em estudos anteriores e propuseram dois padrões para *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. abscessus* e três para *M. peregrinum*.

Nas 13 cepas estudadas foram observados os padrões *M. fortuitum* I, *M. peregrinum* II e *M. chelonae* I o que sugere a utilidade desta técnica em estudos de frequência para fins epidemiológicos.

Conforme citado na literatura internacional, existem desvantagens na identificação pelos métodos fenotípicos das quais salienta-se a diversidade de testes necessários para definição da espécie (muitas vezes não conclusiva) e o tempo necessário para leitura das provas e conclusão do exame^{2,10,17}.

Os resultados desse estudo sugerem que a identificação de micobactérias devido a sua complexidade deva ser centralizada em laboratórios de referência e implementada com testes mais específicos para cada espécie e que possibilitem a elucidação rápida do diagnóstico.

RIALA6/923

Blanco, R. M. et al. Strategies for identification of the *Mycobacterium fortuitum* complex species. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):91-96, 2002

ABSTRACT. The rapidly growing mycobacteria, previously classified as *Mycobacterium fortuitum* complex, has recently been designated *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* and *M. abscessus*. The identification of these mycobacteria is important for establishing the proper treatment, because they have different patterns to drugs. Among 3,441 cultures of mycobacteria received in 1999 by the Mycobacteria Laboratory of the Adolfo Lutz Institute, 13 cultures classified as *M. fortuitum* complex were selected to be studied. The study included isolation of colonies in order to ensure the purity of the cultures, the addition of tests with carbohydrate and citrate, which differentiate the four previously mentioned species and the use of the PCR restriction analysis of *hsp65* (PRA) for the analysis of dubious results in conventional tests. In the analysis of the 13 cultures, it was observed that eight showed two types of colonies (smooth and rough) and the remaining five showed only one type. The identification by PRA technique and by conventional tests agreed to the majority of the strains. The results of this study suggest that the identification of mycobacteria, due to its complexity, should be centralized in Reference Laboratories and implemented with specific tests for each specie in order to give a rapid diagnosis.

KEY-WORDS. *Mycobacterium fortuitum*, fenotipic identification, PCR.

REFERÊNCIAS

1. Collins, C.H.; Grange, J.M.; Yates, M.D. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. 2nd London; Butterworth-Heinemann: 1997; 139p.
2. Devallois, A.; Goh, K.S.; Rastogi, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-Restriction Fragment Length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **J.Clin.Microbiol.** 35:2969-2973, 1997.
3. Euzéby, JP. List of bacterial names with standing in nomenclature [on line] Available from; URL:<http://www-sv.cict.fr/bacteriol/>. [1999 Oct]
4. Falkinham, III; O, J. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.** 9(2):177-215, 1999.
5. Kent, P.T.; Kubica, G.P. Public Health Mycobacteriology. **A guide for the level III laboratory**. Atlanta; 1985, 207p.
6. Kusunoki, S.; Ezaki, T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. reg., and elevation of *Mycobacterium* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**; 42 (2): 240-245, 1992.
7. Leão, S. C. Infecções por micobactérias de crescimento rápido são mais frequentes. **Sala satélite: MD Millennium Diagnósticos – Consultoria** [<http://www.saudeatotal.com/microbiologia/micobact.htm>]. 13 de maio de 2002.
8. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da tuberculose**. 2^a. ed. Rio de Janeiro; 1994, 115p.
9. Osugui, S. K. et al. **Infecções cutâneas causadas por micobactérias de crescimento rápido**. in: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia-Simpósio de Micobactérias; 2001 out 21-25; Foz do Iguaçu, PR (Resumo S-066).

10. Ringuet, H. et al. hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.** 37: 852-857, 1999.
11. Seabra, F.P. et al. Ceratite pelo *Mycobacterium chelonae* após laser in situ ceratomileusis (lasik) estudo microbiológico e histopatológico: relato de um caso-P018. **Resumo dos painéis do XXXI Congresso de Oftalmologia**. [<http://www.abonet.com.Br/abo/644s/painel01.htm>]. 13 de maio de 2002.
12. Silcox, V.A.; Good, R.C.; Floyd, M.M. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. **J. Clin. Microbiol.** 14 (6): 686-691, 1981.
13. Telenti, A. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polym erase chain reaction and restriction analysis. **J Clin Microbiol.** 31(2): 175-178, 1993.
14. Tsukamura, M.; Ichikawa, S. Numerical classification of rapidly growing nonphotochromogenic mycobacteria. **Microbiol Immunol.** 30 (9): 863-882, 1986.
15. Wayne, L.G.; Kubica, G.P. Genus *Mycobacterium*. Lehmann and Neumann 1896. In Sneath, P.H.A. et al. editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: the Willians &Wilkins; p. 1435-57,1986
16. Winthrop, KL et. al. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon **New England J. Med.** 346:1266-371, 2002.
17. Yakrus, M.A. et al. Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. **J. Clin Microbiol** 39:4103-4110, 2001

Recebido em 10/06/2002; Aprovado em 01/10/2002

Cinética celular em lesões pré-invasivas e invasivas do epitélio escamoso cervical: estudo morfológico e imunoistoquímico

Cellular kinetics in preinvasive and invasive lesions of cervical squamous epithelium: morphologic and immunohistochemical study

Luzia S. U. YAMAMOTO^{1*}
Marina Y. S. MAEDA¹
Janaína E. PITTOLI³
Evandro S. de MELLO⁴
Luciana de O. LEANDRO³
Alda WAKAMATSU¹
Celso di LORETO⁴

RIALA6/924

Yamamoto, L. S. U. et al. Cinética celular em lesões pré-invasivas e invasivas do epitélio escamoso cervical: estudo morfológico e imunoistoquímico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(2):97-101, 2002

RESUMO. Avaliar quantitativamente a apoptose (morte celular programada) e a taxa de proliferação celular no espectro das lesões neoplásicas do colo uterino. Materiais e Métodos: Analisamos 81 biópsias cervicais previamente diagnosticadas na Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz segundo a classificação da OMS como sendo: neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 NIC 1 = 20, NIC 2 = 19, NIC 3 = 23 e carcinoma de células escamosas (CCE) = 19. Foi utilizado o método imunoistoquímico para detecção das células em proliferação (MIB-1) e o método de TUNEL para a apoptose. As células foram contadas através de fotomicrografia digital, sendo que o número variou de 83 a 2975 (média = 1515,62) para MIB-1 e 315 a 3565 para apoptose (média = 1273,24). Resultados: Houve um aumento progressivo nas taxas de proliferação (%) com a severidade da lesão (NIC 1 = 22,7; NIC 2 = 34,5; NIC 3 = 38,3; CCE = 52,6 p < 0,0001). O mesmo foi obtido com as taxas de apoptose (%) (NIC 1 = 0,30; NIC 2 = 0,55; NIC 3 = 0,70; CCE = 1,19 p < 0,0001) e o índice de renovação celular (%) (NIC 1 = 23,0; NIC 2 = 35,0; NIC 3 = 39,0; CCE = 53,8 p < 0,0001). Surpreendentemente a razão das taxas proliferação / apoptose não mostrou aumento progressivo (NIC 1 = 75,6; NIC 2 = 62,7; NIC 3 = 54,7; CCE = 44,2). Conclusão: Observamos aumento paralelo tanto nas taxas de proliferação como nas de apoptose com o grau das lesões cervicais. As taxas crescentes de apoptose possivelmente representam a persistência de alguns mecanismos compensatórios de regulação da população celular.

PALAVRAS CHAVE. apoptose, proliferação celular, epitélio escamoso cervical, imunoistoquímica

¹Divisão de Patologia - Instituto Adolfo Lutz - Central - SP; ³ Estagiária FÉDIAL / FUNDAP; ⁴ Médico Citopatologista
*Endereço para correspondência Av. Dr. Arnaldo, 351 - 7º andar, tel 3068-2875 Cerqueira César - São Paulo - SP.
CEP- 01246-902

INTRODUÇÃO

Uma das propriedades fundamentais de malignidade é a vantagem seletiva de crescimento sobre os tecidos normais, que parece derivar pelo menos em parte, de uma taxa inadequada de morte celular das células neoplásicas. Em estudos quantitativos, os tumores tendem a mostrar taxas de replicação maiores do que as esperadas pela sua taxa de crescimento, indicando algum tipo de perda celular¹⁹. Entretanto, o controle dessa população celular depende do equilíbrio dos mecanismos de proliferação e morte celular.

A morte celular é comumente considerada um processo patológico. Entretanto, em várias circunstâncias (incluindo a renovação celular normal, o desenvolvimento embrionário e o equilíbrio trófico estabelecido pelo estado hormonal) a morte celular é induzida por estímulos fisiológicos, e parece ter um papel importante na regulação do tamanho e da forma tecidual. A morte celular sob estas circunstâncias, é chamada de apoptose, sendo morfológicamente distinta da necrose que foi identificada também em processos patológicos, incluindo neoplasias.

Ainda que as pesquisas da carcinogênese usualmente estejam centradas na proliferação celular⁹, o papel da apoptose tem sido recentemente objeto de intensa investigação. Tem-se descoberto que os mecanismos envolvidos na regulação da proliferação celular são freqüentemente superponíveis com os da apoptose¹³. Uma alteração desses mecanismos, pode, portanto, resultar na sobrevivência de células geneticamente lesadas que usualmente sofreriam apoptose, e desempenhar um papel importante na evolução de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas.

Diversos estudos têm mostrado relação entre taxa de apoptose e prognóstico em neoplasias malignas como neuroblastoma² e adenocarcinoma de próstata¹.

Apesar das neoplasias do colo uterino serem uma questão prioritária em saúde pública e este ser o modelo de neoplasia mais bem estudado, somente recentemente têm surgido publicações que avaliam as taxas de apoptose no epitélio cervical, com neoplasias intra-epiteliais e invasoras. Nestes estudos, resultados contraditórios têm sido obtidos. Enquanto alguns autores relatam uma menor taxa de apoptose em lesões de alto grau^{17,22}, outros obtiveram resultados justamente contrários^{3,7,9,11,14,18}.

No presente estudo propomos avaliar quantitativamente a taxa de apoptose e proliferação celular em neoplasias epiteliais cervicais para conhecermos melhor a cinética celular no espectro das neoplasias cervicais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas retrospectivamente 81 biópsias de colo uterino, processadas histologicamente e emblocadas em parafina do arquivo da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. As amostras consideradas adequadas para este estudo

consistiram de 20 casos de neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC 1), 19 de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2), 23 de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3) e 19 de carcinoma de células escamosas (CCE). Os critérios diagnósticos utilizados foram os definidos pela Organização Mundial de Saúde²⁰.

Método Imunoistoquímico

Para avaliação da taxa de proliferação, o material histológico foi submetido à marcação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-Ag Ki-67 clone MIB-1, utilizando-se para amplificação o método de Streptavidina-biotina-peroxidase¹⁰, com recuperação antigênica por aquecimento em panela de pressão com ácido cítrico 0,01M pH 6,0. O anticorpo primário MIB-1 (Immunotech) foi utilizado na diluição 1/100, com incubação por 30 minutos a 37°C e *overnight* (18 horas) a 4°C.

Método de Túnel para detecção de apoptose

Para melhor detecção das figuras de apoptose foi utilizado o método "in situ" para evidenciar as quebras de cadeias de DNA (método de TUNEL) (Intergen Company). Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a digestão enzimática com 20 µg/ml de proteinase K à temperatura ambiente por 15 minutos e lavados com água destilada; tratamento com peróxido de hidrogênio 0,3% (H₂O₂) por 5 minutos à temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena e lavagem com PBS.

Os cortes foram imersos em tampão de equilíbrio a temperatura ambiente por 10 minutos e então incubados com solução de uso de enzima TdT a 37°C por 1 hora. Posteriormente os cortes foram lavados com PBS, incubados com o conjugado anti-digoxigenina peroxidase e substrato da peroxidase para detecção dos sinais de apoptose. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos e montagem dos cortes com Entellan e lamínula.

Contagem das células em proliferação e das células apoptóticas

Para a avaliação de proliferação celular e de apoptose realizamos a contagem de pelo menos 1000 células¹¹ à exceção de alguns casos, onde devido às dimensões pequenas da área correspondente à lesão foram contadas células em menor quantidade. Os corpos apoptóticos mostraram-se corados em castanho, sendo descartadas todas as células que não apresentassem características morfológicas típicas de apoptose, mesmo quando marcadas com a coloração castanho. Posteriormente foram relacionadas as porcentagens de MIB-1 (índices de proliferação) e índices apoptóticos. Os índices de renovação celular (IR) foram obtidos através da somatória dos índices de proliferação (IP) + índices apoptóticos (IA)³. Todas as contagens foram realizadas em imagens digitalizadas das lâminas correspondentes.

Análise estatística

De cada categoria diagnóstica foram calculados a média e o desvio padrão para comparação entre si. Foi definido o valor

de $P < 0,05$ como estatisticamente significativa e as médias individuais foram comparadas usando o Teste "One Way Analysis of Variance" (ANOVA).

RESULTADOS

O número total de células contadas em cada caso variou de 83 a 2.975 (média = 1.515,62) para MIB-1 e 315 a 3.565 para apoptose (média = 1.273,24).

A expressão do antígeno Ki-67 (MIB-1) e dos corpos apoptóticos em diferentes lesões são mostrados nas Fig.1 e Fig. 2.

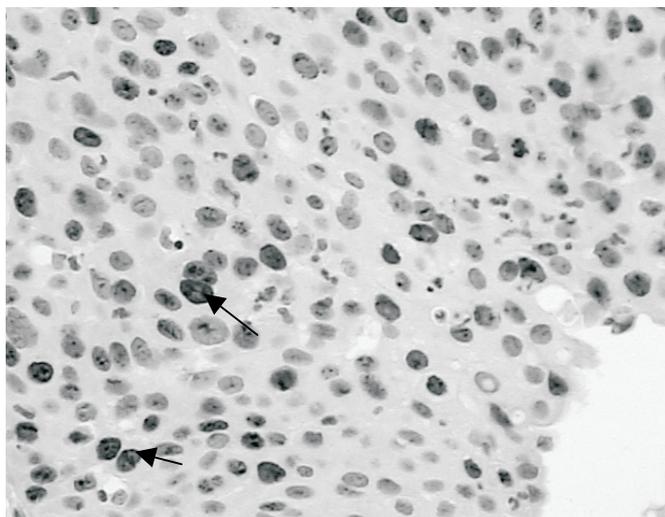


Figura 1. Coloração imunohistoquímica para MIB-1 em NIC 3 (x 200). Núcleos positivos são indicados por setas (↙)

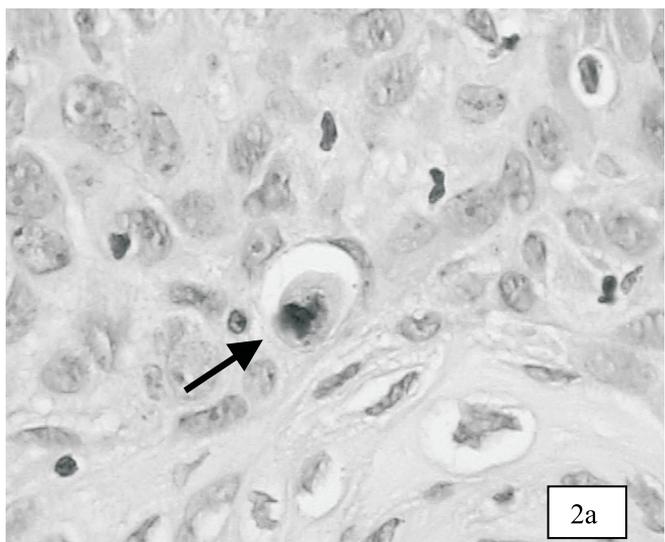


Figura 2a. Corpos apoptóticos pelo método de TUNEL em CCE (x 400)

A tabela 1 mostra a média dos índices de proliferação (IP), índices apoptóticos (IA) e índice de renovação celular (IR) em NIC 1, 2 e 3 e CCE, com o valor de $p < 0,0001$ para os três índices. Ocorreu um aumento progressivo tanto nos índices de proliferação celular como nos índices apoptóticos com a severidade da lesão.

A proporção das taxas de proliferação/apoptose não mostrou aumento progressivo (NIC 1= 75,6; NIC 2= 62,7; NIC 3= 54,7 e CCE= 44,2).

A análise estatística da reatividade imunohistoquímica revelou diferenças significante (**) e altamente significativa (***) ($p < 0,05$) entre: NIC 1 e NIC 3 ($p < 0,05^*$), NIC 1 e CCE ($p < 0,001^{***}$), NIC 2 e CCE ($p < 0,01^{**}$) para MIB-1; NIC 1 e CCE ($p < 0,001^{***}$); NIC 2 e CCE ($p < 0,01^{**}$) para apoptose, como também entre NIC 1 e NIC 3 ($p < 0,05^*$), NIC 1 e CCE ($p < 0,001^{***}$) e NIC 2 e CCE ($p < 0,01^{**}$) para o índice de renovação celular.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O controle da população celular tanto em situações normais como neoplásicas depende do equilíbrio entre crescimento e morte das células. Na cérvix uterina normal as células basais são estimuladas a sofrerem proliferação, maturação e descamação sob a ação de estrógenos de forma que a população se renova a cada 4 ou 5 dias⁵. Nas lesões do colo uterino relacionado com a infecção pelo HPV²¹, ocorre morte programada (apoptose) de células escamosas quando o agente viral infecta as células epiteliais, como mecanismo de defesa do hospedeiro, no intuito de evitar a produção de novas partículas virais. Acredita-se que a proteína E6, do HPV incorporado à célula hospedeira, interfira com a proteína p53, fazendo com que

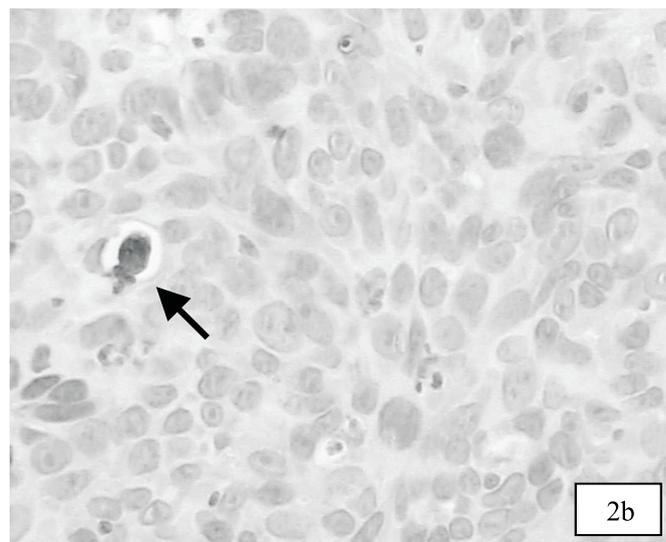


Figura 2b. Corpos apoptóticos pelo método de TUNEL em CCE (x 400)

Tabela 1. Imunoexpressão em média \pm desvio padrão dos índices de proliferação, apoptótico e renovação celular nas neoplasias cervicais do colo uterino.

Diagnóstico	Nº casos	IP (%)	IA (%)	IR (%)
NIC 1	20	22,75 \pm 14,92	0,30 \pm 0,28	23,05 \pm 14,88
NIC 2	19	34,50 \pm 16,48	0,55 \pm 0,47	35,00 \pm 16,83
NIC 3	23	38,35 \pm 14,27	0,70 \pm 0,54	39,00 \pm 15,67
CCE	19	52,68 \pm 19,00	1,19 \pm 0,93	53,8 \pm 23,73

IP = Índice de proliferação, IA = Índice apoptótico, IR = Índice de renovação celular

NIC 1 = neoplasia intraepitelial cervical grau 1, NIC 2 = neoplasia intraepitelial cervical grau 2, NIC 3 = neoplasia intraepitelial cervical grau 3, CCE = carcinoma de células escamosas.

não ocorra a apoptose e a atividade proliferativa esteja aumentada⁴.

A proliferação celular pode ser avaliada na rotina através da contagem de mitoses. Existem entretanto alguns problemas na identificação das mesmas, requerendo exame cuidadoso de forma que, figuras duvidosas ou núcleos picnóticos não sejam aceitos⁸. Atualmente, o método mais empregado para avaliar a proliferação celular, tem sido pela expressão antigênica do Ag Ki-67 detectada pelo método imunoistoquímico, sendo que sua contagem é expressa sob forma de porcentual de células positivas¹⁵. O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear presente nas células em todas as fases do ciclo de divisão celular, exceto na G0⁷.

A apoptose é o tipo de morte celular responsável pela deleção das células em tecidos normais e tumorais. Os corpos apoptóticos são morfológicamente reconhecidos ao exame microscópico de rotina³, sendo este ainda atualmente o padrão-ouro. Durante muitos anos a identificação da apoptose e sua mensuração foi baseada apenas na morfologia^{12,16}. Tal estratégia torna-se difícil em algumas situações como neoplasias intraepiteliais, onde a presença de leucócitos intraepiteliais pode simular corpos apoptóticos. Recentemente a identificação morfológica de células em apoptose tornou-se mais sensível com o auxílio da técnica de marcação de fragmentos de DNA (TUNEL)⁶. Este método se baseia na ligação específica de nucleotídeos marcados catalisada pela deoxinucleotidil transferase (TdT) aos terminais 3'-OH do DNA, nas áreas de fragmentação.

Neste estudo, avaliamos quantitativamente a proliferação celular pela imunoreatividade do antígeno Ki-67 (MIB-1) e a apoptose através do reconhecimento morfológico ressaltados pelo método de TUNEL em lesões neoplásicas intraepiteliais (NIC 1, NIC 2 e NIC 3) e carcinomas cervicais.

Em nossa análise observamos um aumento progressivo tanto nas taxas de proliferação como na apoptose com o grau das lesões cervicais. Houve diferença significativa entre as lesões de baixo grau (NIC 1), alto grau (NIC 3) e invasivas tanto para os índices de proliferação celular como para apoptose. Tais achados são semelhantes aos obtidos por Gerdes et al.⁷; Isacson et al.¹¹; Harmsel et al.⁹; Sagol et al.¹⁸; Dey et al.³ e Lee et al.¹⁴ que também

observaram aumento progressivo tanto de proliferação como de apoptose, à medida que aumentava a severidade das lesões neoplásicas do colo uterino. Paradoxalmente, Sheets et al.²² e Rogovskaya et al.¹⁷ relataram diminuição progressiva de apoptose nestas lesões cervicais.

O aumento da taxa de proliferação é um fenômeno bem conhecido no desenvolvimento das neoplasias¹⁴. Mas o aumento da taxa de apoptose é, aparentemente, paradoxal. As taxas crescentes de apoptose, encontradas por nós e pela maior parte de outros autores^{3,6,9,11,18} que investigaram o assunto, possivelmente representam a persistência de alguns mecanismos compensatórios de regulação da população celular. Esta persistência possivelmente é insuficiente, no entanto, para reestabelecer o estado normal de equilíbrio da população celular encontrado nos tecidos normais, havendo um déficit relativo da taxa de morte celular.

Os valores da razão das células positivas para MIB-1/corpos apoptóticos resultam no favorecimento da proliferação com a severidade da lesão, como ocorreu com o aumento da taxa de renovação celular. Esse aumento progressivo do IR a cada grau diferente da lesão reflete a importância dos eventos de proliferação e morte celular no desenvolvimento das neoplasias³.

Quando comparamos nossos achados com o comportamento clínico, observamos que as lesões de baixo grau, as quais desaparecem espontaneamente, em cerca de 80% dos casos apresentam índices de apoptose e proliferação celular significativamente mais baixo que os das lesões de alto grau, os quais raramente se curam espontaneamente. Tais dados devem ser melhor estudados, eventualmente amparados com a tipagem viral, uma vez que a apoptose como mecanismo de "clareamento" da infecção viral deveria ser mais intensa nas lesões de baixo grau.

O entendimento da cinética tecidual é fundamental para melhor conhecimento dos processos envolvidos na carcinogênese. O estudo das proteínas que regulam o ciclo celular, tanto em direção à proliferação quanto à apoptose, deve ser o próximo passo nessa linha de investigação, bem como a avaliação deste processo por meio da quantificação das regiões organizadoras de nucléolo marcadas pela prata (AgNor).

Yamamoto, L.S.U. et al. Cellular kinetics in preinvasive and invasive lesions of cervical squamous epithelium: morphologic and immunohistochemical study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(2):97-101, 2002

ABSTRACT: To assess proliferative and apoptotic rates in squamous lesions of the uterine cervix. **Material and Methods:** 81 cervical biopsies were classified as cervical intraepithelial neoplasia grade 1 CIN1 = 20, CIN2 = 19, CIN3 = 23 and squamous cell carcinoma (SCC) = 19, according to WHO classification. Histological sections were submitted to MIB-1 immunostaining by streptavidin-peroxidase amplification. In situ end-labeling of DNA strand breaks by TUNEL method was used to enhance the detection of apoptosis. All cells representative of the pertinent lesion were counted in each sample in digital photomicrographs and the results were expressed as positive cells %. The groups were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was defined as a $P < 0.05$. **Results:** There was progressive increase of proliferation rate (%) with the severity of lesion CIN 1 = 22.7; CIN 2 = 34.5; CIN 3 = 38.3; SCC = 52.6 $p < 0.0001$). The same was obtained with apoptotic rate (%) (CIN 1 = 0.30; CIN 2 = 0.55; CIN 3 = 0.70; SCC = 1.19 $p < 0.0001$), and turnover rate (%) (CIN 1 = 23.0; CIN 2 = 35.0; CIN 3 = 39.0; SCC = 53.8 $p < 0.0001$). Surprisingly, the ratio of proliferation/apoptotic rate did not show a progressive increase (CIN 1 = 75.6; CIN 2 = 62.7; CIN 3 = 54.7; SCC = 44.2). **Conclusions:** There is an increase in both proliferation and apoptosis with increasing atypical in cervical lesions. Increase in apoptotic rate possibly represents persistence of some compensatory regulation mechanisms of cell population.

KEY WORDS. apoptosis, cell proliferation, cervical squamous epithelium, immunohistochemistry

REFERÊNCIAS

1. Aihara, M.; Scardime, P.T.; Truong, D.L.. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of prostate. *Cancer*, 75: 522-529, 1995.
2. Brook, F.B. et al. Histologic and immunohistochemical investigation of neuroblastomas and correlation with prognosis. *Hum Pathol*, 19: 879-888, 1988.
3. Dey, P.; Das, R.; Sabuddin. Correlations between apoptotic and proliferative indices in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*, 43: 271-275, 2000.
4. Di Loreto, C.; Alves, V.A.F. Patologia das lesões relacionadas ao HPV no trato anogenital. In: Bibbo, M.; Moraes Filho, A. (ed). **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. 1º ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 107-116.
5. Ferenczy, A.; Wight, T.C. Anatomy and Histology of the cervix. In: Kurman, R.J.; Blaustein, A. (ed). **Pathology of the female genital tract**. New York: Springer-Verlag; 1994. p. 185-201.
6. Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119: 493-501, 1992.
7. Gerdes, J. et al.. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31: 13-20, 1983.
8. Hall, P.A. ; Lewinson, D.A. Review: Assesment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, 43: 184-192, 1990.
9. Harmsel, B. et al. Progressing imbalance between proliferation and apoptosis with increasing severity of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*, 16: 205-211, 1997.
10. Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580, 1981.
11. Isacson, C. et al. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res*, 56: 669-674, 1996.
12. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis a basic biological phenomena with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
13. Leach, A.P. Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death. *Clin Lab Sci*, 11: 346-9, 1998.
14. Lee, J.S. et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in progression of cervical neoplasia. *Anal Quant Cyto Histol*, 24 (2): 103-113, 2002.
15. Maeda, M.Y.S. – **Imunoreatividade do PCNA, Ki-67 e p53 em diferentes lesões do colo uterino humano**. São Paulo, 1999 [Dissertação de Mestrado – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo].
16. Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15, 1995.
17. Rogovskaya, S.I. et al. Apoptosis in woman uterine cervix in pathologies associated with human papillomavirus. *Bull Exp Biol Med*. 131 (6): 576-582, 2001.
18. Sagol, O. et al. Apoptotic and mitotic index in squamous cell carcinomas and premalignant lesions of the uterine cervix. *Int J Surg Pathol*, 7: 155-160, 1999.
19. Sarraf, C.E.; Bowen, I.D. Kinetic studies on a murine sarcoma and na analysis of apoptosis. *Br J Cancer*, 54: 989-998, 1986.
20. Scully, R.E. et al. **Histological typing of female genital tract tumours**. 2º ed. Boston: Springer-Verlag; 1994. p. 39-54.
21. Schiffman, M.H. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 85: 958-964, 1993.
22. Sheets, E.E.; Crum, C.P.; Yeh, J. Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by in situ nuclear labeling. *Gynecol Oncol*, 63: 94-100, 1996.

Recebido em 03/07/2002 ; Aprovado em 05/11/2002

Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e freqüência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado

Sandfly ecological observations in Eldorado County, Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil, an endemic area of American Cutaneous Leishmaniasis. Period between 1996 and 1997. I – Sazonality and frequency of *Lutzomyia ayrozai* to different ecotopes with sentinels animals in forest environment.

Helena H. TANIGUCHI*
José Eduardo TOLEZANO¹
Rui LAROSA¹
Carlos R. ELIAS¹
Eunice A. B. GALATI²

RIALA6/925

Taniguchi, H. H. et al. Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e freqüência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):103-112, 2002

RESUMO. Com o objetivo de se avaliar a participação de flebotomíneos e de animais domésticos, domiciliados e/ou silvestres na epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana, foram realizadas observações em área periurbana do município de Eldorado, Vale do Ribeira, São Paulo. No interior da mata, as capturas de flebotomíneos ocorreram no período de janeiro de 1996 a dezembro de 1997, com armadilha de Shannon e armadilhas luminosas, tipo Falcão modificada e em ecótopos artificiais para manutenção de galinhas, marsupiais, roedores silvestres, hamsters e cães com papéis embebidos com vaselina líquida, além de um pano branco estendido na parede dos recintos. A fauna de flebotomíneos esteve representada por 10 espécies e um total de 1.066 exemplares capturados. A presença de iscas animais não interferiu na diversidade das espécies de flebotomíneos. *L. ayrozai* foi a espécie predominante nesse ambiente revelando maior atividade nos meses mais secos do ano, entre abril e julho. A presença marcante dessa espécie em ambiente florestal, confere-lhe condições potenciais para o papel de vetor de *Leishmania* sp em seu ciclo silvestre na região.

PALAVRAS CHAVES. Leishmaniose Tegumentar Americana, ecologia, vetores, *L. ayrozai*, Phlebotominae, isca animal, Vale do Ribeira

¹ Instituto Adolfo Lutz - Seção de Parasitoses Sistêmicas

² Faculdade de Saúde Pública/USP - Departamento de Epidemiologia

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 São Paulo SP Cep 01246-902 - e-mail: hhtaniguchi@zipmail.com.br

INTRODUÇÃO

Até a primeira metade do século XX, a região do Vale do Ribeira era considerada como área indene para Leishmaniose Tegumentar Americana.

Os primeiros casos foram relatados por Forattini & Oliveira¹², no município de Jacupiranga, seguido de um longo período sem que novos casos fossem registrados.

A partir da década de 70, torna-se importante área de transmissão autóctone e, já, apresentando feições de transmissão intra e/ou peridomiciliar (Rocha e Silva *et alii*²³; Tolezano *et alii*²⁹).

No período de 1981 a 1995, foram detectados 914 casos autóctones, distribuídos de forma não homogênea entre os municípios da região do Vale do Ribeira, com 22,9% desses, registrados no município de Eldorado. Os maiores coeficientes de incidência de LTA por 100.000 habitantes nesse município foram nos anos de 1981 (139,8), 1985 (132,0), 1986 (179,1), 1987 (224,8) e 1993 (403,5) (Domingos⁶). Ainda segundo essa autora, no período em questão, o coeficiente de incidência de LTA na população rural (167,6/100.000 hab.) mostrou diferença significativa em relação ao da população urbana (12,5/100.000 hab.). Os casos ocorreram em ambos os sexos, em todas as faixas etárias e 93,3% dos mesmos residiam na localidade provável de infecção. Os municípios com maior risco de transmissão (coeficientes de incidência mais elevados) foram Eldorado, Pedro de Toledo, Barra do Turvo e Itariri e, também, foram os que apresentaram as médias mais elevadas de *L. intermedia s.l.* capturadas (Domingos⁶).

No período entre 1994 e 1997, foram registrados 178 casos na região do Vale do Ribeira, sendo Eldorado, Miracatu e Itariri as localidades com maior número de casos, 23, 23 e 50 casos, respectivamente (Fonte: Divisão de Zoonoses – Centro de Vigilância Epidemiológica – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo).

Frente ao quadro de ocorrência da LTA no Vale do Ribeira, limite sul da expansão da doença no Estado de São Paulo, este trabalho teve como objetivo investigar aspectos relacionados à participação de flebotômíneos e de animais silvestres, domiciliados e/ou domésticos na epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no município de Eldorado, Região do Vale do Ribeira

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO - A Estância Turística de Eldorado, antiga Eldorado Paulista, localiza-se no Vale do Ribeira, 243 km a sudoeste da Capital de São Paulo, entre os paralelos 24°31'07" S e 48°06'28" O, altitude média de 80 m a.n.m, com variações de 30 a 100 m.

A população é de, aproximadamente, 14.000 habitantes com 32% residindo em área urbana, entretanto, 63,5% da população subsiste de atividade agropecuária, extrativismo

vegetal e pesca (Lepsch *et alii*²⁰).

A região do Vale do Ribeira é considerada das menos desenvolvidas do Estado. Em termos sócio-econômicos, manteve-se à margem do desenvolvimento observado no restante do Estado, principalmente em função da topografia acidentada e das condições de clima e solo que dificultam as práticas agrícolas e da precariedade das vias de acesso à região. Apresenta poucas áreas apropriadas para a agricultura - cultura de banana, chá, e para a pecuária ao lado de outras com vegetação natural intacta ou pouco alterada.

O relevo é predominantemente montanhoso mas, ao sul, encontram-se planícies cobertas de vegetação abundante. Inúmeros ribeirões recortam a região, todos tributários do rio Ribeira de Iguape. Saltos, cachoeiras e grutas contribuem na composição paisagística da área.

Segundo a Sociedade Brasileira de Espeleologia (1980), a região do Vale do Ribeira apresenta a maior concentração de cavernas calcárias do Brasil, muitas delas constituindo importantes sítios arqueológicos e paleontológicos, além de importante polo turístico, como a Caverna do Diabo, em Eldorado.

O clima sofre influência de duas massas de ar, a Tropical Atlântica (influi na distribuição das chuvas) e a Polar Atlântica (responsável pelas baixas temperaturas, 2-3°C). A classificação climática de Köppen define o clima da região como tipo "CFA", isto é, tropical úmido, sem estação seca, sendo a temperatura do mês mais quente superior a 22°C, chegando a 30-35°C e o total de chuvas do mês mais seco superior a 30 mm, com média anual de 1619 mm. Os meses mais chuvosos são janeiro, fevereiro e março, excepcionalmente, dezembro, abril e maio, enquanto os meses mais secos concentram-se entre julho e setembro (Lepsch *et alii*²⁰).

A cobertura vegetal do município é do tipo Floresta Tropical Latifoliada, caracterizada por árvores com 30 m ou mais de altura. Neste município, ainda, se encontram vastas áreas de florestas alteradas, capoeiras, área de reflorestamento e áreas de ação antrópica, que correspondem às áreas de agricultura, pastagens, núcleos urbanos e desmatamento (Lepsch *et alii*²⁰).

LOCALIZAÇÃO DOS ECÓTOPOS - Em uma área de 500 a 600 m², adentrando 50 m no interior da mata, foram construídos 5 recintos para a manutenção de animais sentinelas, com um mínimo de alteração possível na paisagem natural. Os animais permaneceram expostos ao contato com as populações de flebotômíneos que, habitualmente, freqüentam esse ambiente. As construções foram feitas em dimensões adequadas para a permanência das espécies animais, lá expostas, segundo orientação de veterinário, com fornecimento de água e alimentação apropriada "*ad libitum*". Cada ecótopo albergou uma espécie de animal, excetuando-se aquele destinado aos roedores silvestres, em que diferentes espécies permaneceram num mesmo recinto, porém, individualizadas nas gaiolas destinadas a cada uma delas. O total de animais expostos compreendeu 6 cães (*Canis familiaris*), 120 hamsters (*Mesocricetus auratus*), 50 galinhas (*Gallus gallus*), 20

marsupiais (*Didelphis marsupialis*), roedores silvestres (*Akodon* sp, 9 *Oryzomys* sp, 2 *Oxymycterus quaestor*, 7 *Rattus rattus*). Os animais permaneceram em tempo integral, durante todo o período da pesquisa – jan/96 a dez/97 - sendo substituídos a cada 2 ou 3 meses de permanência por outros da mesma espécie.

CAPTURA DE FLEBOTOMÍNEOS - Foram realizadas no interior de mata com o uso de armadilha de Shannon; armadilha luminosa, tipo Falcão, modificada; papel ofício A-4 (sulfite), embebido com vaselina líquida; pano branco (2x2 m) estendido nas paredes do ecótopo.

Anteriormente à introdução dos animais nos recintos, foram efetuadas algumas capturas de flebotômíneos com o objetivo de se conhecer a fauna aí presente, entre agosto e dezembro/95.

As capturas nos ecótopos localizados no interior da mata ocorreram com a seguinte periodicidade:

- a) No período de janeiro/96 a dezembro/97, mensalmente, um pano branco foi estendido em uma das paredes internas de cada recinto, no horário das 18h30 às 21h30. Um indivíduo capturou os flebotômíneos no pano com o captador de Castro, iluminado por um lâmpião a gás.
- b) Bimensalmente, de janeiro/96 a dezembro/97, 3 folhas de papel Ofício A-4 branco (sulfite) embebidas com vaselina líquida, alinhadas a 1 m do solo, permaneceram expostas no interior de cada recinto, por 48 h.

c) Bimensalmente, de janeiro/96 a dezembro/97, foi instalada, no interior de cada recinto, uma armadilha luminosa, tipo Falcão, modificada, no horário das 19h às 8 h.

d) Também, foram realizadas capturas simultâneas, em armadilhas de Shannon, montadas a 5 metros de distância dos recintos dos gambás e dos hamsters, respectivamente. Este procedimento ocorreu mensalmente, no horário das 18h30 às 21h30, durante o período de janeiro/96 a dezembro/97, com um indivíduo capturando em cada ambiente.

e) Mensalmente, de janeiro/96 a dezembro/97, foi instalada uma armadilha luminosa, tipo Falcão, modificada entre 19h e 8h, a 10 m de altura em uma árvore distante 15 m do recinto mais próximo.

Durante o mês de fevereiro/97 não foi realizada a captura devido a inundações de parte das vias de acesso.

Para a quantificação da freqüência de alguns dados, utilizou-se da Média geométrica de Williams, visando facilitar a visualização dos mesmos.

DADOS METEOROLÓGICOS - Os dados meteorológicos (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) referentes ao período de janeiro/96 a dezembro/97 foram obtidos do Posto do DAEE – Registro/SP (Figura 1).

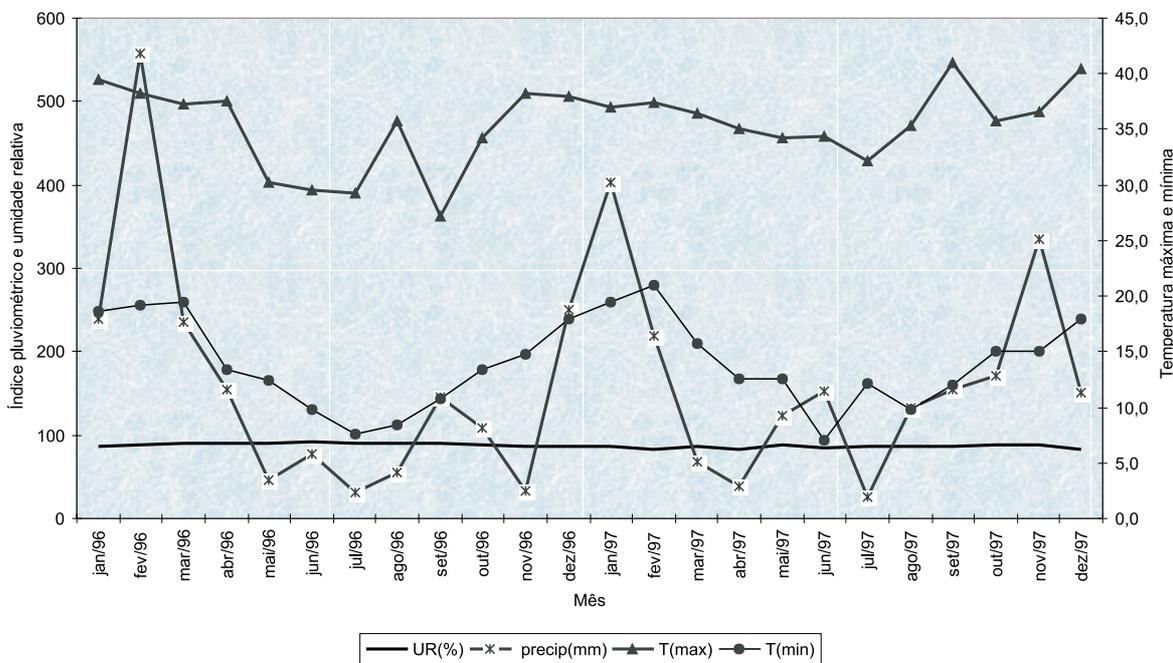


Figura 1 – Temperatura máxima e mínima, umidade relativa do ar e índice pluviométrico no período de janeiro/96 a dezembro/97 município de Eldorado, SP, Brasil.

Tabela 1 – Número e percentual de flebotomíneos coletados em interior de mata, com ou sem a presença de animais sentinelas. Município de Eldorado, agosto/95 a dezembro/97.

ESPÉCIE	Sem animais				Com animais			
	M	F	TOTAL	%	M	F	TOTAL	%
<i>L. intermedia sl</i>	27	11	38	13,15	32	18	50	6,44
<i>L. fischeri</i>	3	62	65	22,49	17	124	141	18,15
<i>L. migonei</i>	2	4	6	2,08	23	60	83	10,68
<i>L. ayrozai</i>	47	125	172	59,52	157	324	481	61,90
<i>L. monticola</i>	-	6	6	2,08	3	10	13	1,67
<i>L. ferreirana</i>	-	1	1	0,35	-	-	-	-
<i>L. pestanai</i>	-	-	-	-	-	2	2	0,26
<i>L. edwardsi</i>	-	1	1	0,35	-	-	-	0,00
<i>L. firmatoi</i>	-	-	-	-	-	6	6	0,77
<i>B. troglodytes</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,13
TOTAL	79	210	289	100,0	233	544	777	100,0

M=macho F=fêmea

RESULTADOS

As capturas de flebotomíneos realizadas no período de agosto/95 a dezembro/97, com o emprego dos diferentes métodos totalizaram 1.066 insetos, sendo 312 (29,27%) machos e 754 (70,73%) fêmeas, distribuídos entre os gêneros *Lutzomyia* (9 espécies) e *Brumptomyia* (1 espécie), com predomínio de *L. ayrozai* (61,26%), espécie com hábitos silvestres, seguido de *L. fischeri* (19,32%), *L. migonei* (8,35%) e *L. intermedia s.l.* (8,25%). Essas quatro espécies totalizaram 97,18% em relação ao total nesse ambiente (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra a frequência das espécies mais numerosas coletadas no interior de mata, computadas as capturas em armadilha de Shannon, luminosa em copa de árvore e nos diferentes ecótopos construídos nesse ambiente. Nota-se a abundância de *L. ayrozai* e a pouca frequência de *L. intermedia s.l.*

Diferença na composição das espécies obtidas em um mesmo ambiente, utilizando-se de armadilhas de Shannon montadas, simultaneamente, com distância de 50 metros entre elas, pode-se verificar na Figura 2. Essas capturas revelaram, ainda a razão macho/fêmea igual a 1:2,9.

Em armadilha luminosa, tipo Falcão modificada, colocada em copa de árvore a 10 m de altura do solo, sem iscas animais, observa-se nítido predomínio de *L. ayrozai* sobre as demais espécies, *L. fischeri*, *L. monticola*, *L. migonei*, *L. intermedia s.l.* e *Brumptomyia troglodytes* (Figura 3).

As frequências de flebotomíneos, segundo espécie e animal sentinela nas 588 horas de captura em cada ecótopo, podem ser vistas na Tabela 3.

As coletas em papel branco embebido com vaselina líquida totalizaram 2.208 horas ao término do segundo ano da investigação em cada ecótopo e apenas 51 espécimens, distribuídos entre as quatro espécies mais frequentes. A isca

representada pela galinha foi a que mais atraiu (56,9%) e *L. migonei* predominou (41,1%) sobre as demais espécies (Tabela 4).

Nas capturas realizadas com pano branco estendido no interior dos 5 ecótopos, localizados no interior da mata foram gastos 69 horas de coleta em cada um deles. Coletou-se 267 exemplares: 11 (4,12%) *L. intermedia s.l.*; 51 (19,10%) *L. fischeri*; 21 (7,87%) *L. migonei* e 84 (68,91%) *L. ayrozai* (Tabela 5).

DISCUSSÃO

No interior da mata, foram utilizados os animais que naturalmente habitam esse ambiente e outros que foram introduzidos em função de sua frequência esporádica – os cães, as galinhas, como representantes do grupo das aves, unicamente como fonte sangüínea, e os hamsters, como modelo experimental para leishmaniose, largamente utilizado em procedimentos de isolamento de *Leishmania*.

Os dados obtidos nesta investigação, apesar do pequeno número de exemplares capturados, corroboraram os achados de Gomes¹⁶ nos quais, as espécies encontradas no ambiente preservado do Vale do Ribeira, raramente dispersavam-se além desses limites e, também, podem ser comparados aos obtidos, há 20 anos, por Gomes¹⁵ nessa mesma região. Ocorreram algumas variações no tocante à alternância de predomínio entre as espécies, provavelmente em função da própria variação microclimática presente no local.

Todas as abordagens que se seguem foram efetuadas considerando-se apenas as quatro espécies predominantes (*L. ayrozai*, *L. fischeri*, *L. migonei* e *L. intermedia s.l.*).

A presença de *L. intermedia s.l.*, ainda que em pequeno número, pode significar a manifestação da capacidade de frequência ou de colonização no ambiente florestal, matas de

Taniguchi, H. H. et al. Observações ecológicas de flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e frequência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):103-112, 2002

Tabela 2 – Distribuição mensal dos flebotômíneos mais frequentes capturadas no interior de mata. Município de Eldorado, SP, janeiro/96 a dezembro/97.

	<i>L. intermedia s.l.</i>	<i>L. fischeri</i>	<i>L. migonei</i>	<i>L. ayrozai</i>	TOTAL
Jan/96	2	10	4	10	26
Fev/96	1	12	1	3	17
Mar/96	3	5	6	7	21
Abr/96	-	9	2	56	67
Mai/96	3	7	3	42	55
Jun/96	-	-	4	19	23
Jul/96	1	2	1	68	72
Ago/96	-	4	3	11	18
Set/96	1	4	1	1	7
Out/96	5	6	3	8	22
Nov/96	4	13	11	10	38
Dez/96	1	2	6	-	9
Jan/97	-	2	4	1	7
Fev/97
Mar/97	4	4	1	12	21
Abr/97	4	12	4	114	134
Mai/97	6	8	4	50	68
Jun/97	3	8	1	48	60
Jul/97	-	2	1	1	4
Ago/97	-	3	2	5	10
Set/97	2	20	14	10	45
Out/97	5	2	1	-	8
Nov/97	5	4	4	1	15
Dez/97	-	2	2	4	8
TOTAL	50	141	83	481	755

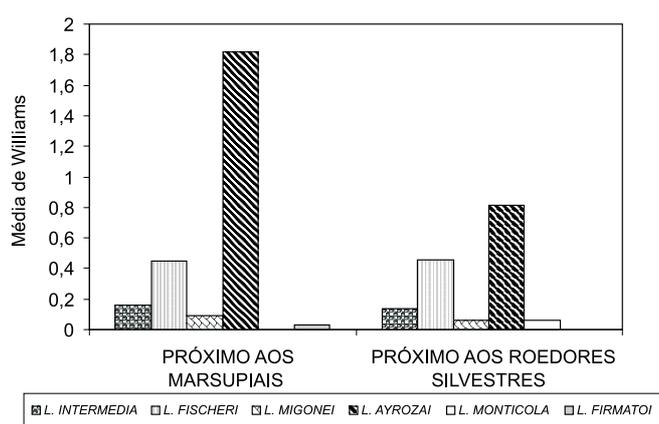


Figura 2 – Média de Williams, por captura, dos flebotômíneos capturados em armadilhas de Shannon, próximo aos ecótopos com marsupiais e com roedores silvestres, no município de Eldorado, SP, Brasil, período de jan/96 a dez/97, entre 10:30 e 21:30 horas.

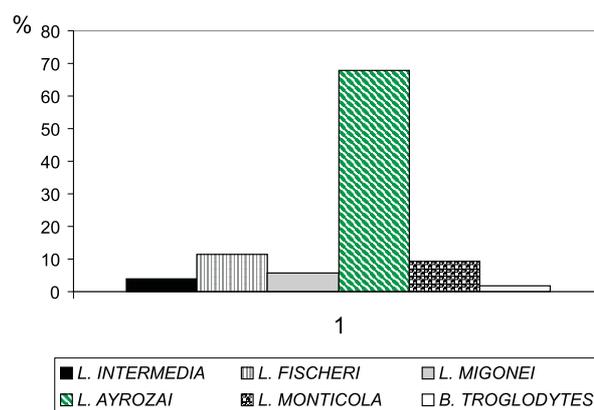


Figura 3 – Percentual de flebotômíneos capturados em armadilha luminosa instalada a 10 m de altura, mensalmente, no interior de mata no município de Eldorado, das 19:00 às 8:00 horas, entre jan/96 a dez/97.

Taniguchi, H. H. et al. Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e frequência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):103-112, 2002

Tabela 3 – Flebotomíneos mais frequentes, coletados em armadilha luminosa, tipo Falcão modificada, instaladas em ecótopos construídos em interior de mata, no município de Eldorado, entre 19:00 e 8:00 horas no período de jan/96 a dez/97.

	<i>L. intermedia s.l.</i>		<i>L. fischeri</i>		<i>L. migonei</i>		<i>L. ayrozai</i>		χ^2
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
CÃO	1	5,00	1	2,56	3	9,09	51	47,66	*130,64
GAMBÁ	5	25,00	8	20,51	3	9,09	8	7,48	1,83
GALINHA	3	15,00	2	5,13	5	15,15	21	19,63	*27,52
HAMSTER	5	20,00	14	35,90	3	9,09	17	15,89	*11,97
ROEDOR	6	30,00	14	35,90	19	57,58	10	9,35	6,27
TOTAL	20	100,0	39	100,0	33	100,0	107	100,0	
χ^2	2,31		*17,03		*26,00		*53,61		

* = nível de 0,05 de significância

Tabela 4 – Flebotomíneos coletados em folhas de papel branco (Ofício A-4) embebidas com vaselina líquida, expostas bimensalmente, nos ecótopos com diferentes iscas construídos no interior de mata no município de Eldorado, SP, Brasil, no período de jan/96 a dez/97.

	<i>L. intermedia s.l.</i>		<i>L. fischeri</i>		<i>L. migonei</i>		<i>L. ayrozai</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CÃO	1	14,29	-	-	-	-	4	30,77
MARSUPIAL	5	71,43	-	-	-	-	3	23,08
GALINHA	-	-	10	100,0	17	80,95	2	15,38
HAMSTER	1	14,29	-	-	4	19,05	4	30,77
ROEDOR	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	7	100,0	10	100,0	21	100,0	13	100,0
χ^2	8,03		*32,62		*45,82		2,46	

* = nível de 0,05 de significância

Tabela 5 – Flebotomíneos capturados no pano branco exposto, mensalmente, nos ecótopos com diferentes iscas construídos no interior de mata no município de Eldorado, entre 18:30 e 21:30 horas, no período de jan/96 a dez/97.

ISCAS	<i>L. intermedia s.l.</i>		<i>L. fischeri</i>		<i>L. migonei</i>		<i>L. ayrozai</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CÃO	3	27,27	17	33,33	1	4,76	23	12,50
MARSUPIAL	1	9,09	5	9,80	2	9,53	15	8,15
GALINHA	3	27,27	14	27,45	6	28,57	64	34,78
HAMSTER	-	-	6	11,76	6	28,57	66	35,87
ROEDOR	4	36,36	9	17,65	6	28,57	16	8,70
TOTAL	11	100,0	51	100,0	21	100,0	184	100,0
χ^2	2,39		8,51		3,63		*70,09	

* = nível de 0,05 de significância

segunda formação ou capoeiras, por essa espécie, como já houvera sido detectada na primeira metade deste século quando, ainda, não ostentava qualquer destaque na transmissão da leishmaniose tegumentar (Barretto⁴). A presença significativa de *L. ayrozai* em ambiente de mata residual ou preservada já havia sido detectada por Gomes¹⁶, observando que essa espécie não apresentava antropofilia em grau elevado e, portanto, “a análise dos resultados no Vale do Ribeira não permitiu concluir que *P. ayrozai* possa assumir importância epidemiológica”,

não se descarta de todo, entretanto, ser esta espécie dotada de condições potenciais para o papel vetorial na hipótese da existência de ciclos silvestres de circulação de *Leishmania* na região.

Nas coletas simultâneas em armadilhas de Shannon distante 5 metros do ecótopo dos gambás, igual distância do ecótopo com roedores silvestres e distância entre as duas de, aproximadamente, 50 metros, observa-se que, próximo aos marsupiais, *L. ayrozai* mostrou-se mais freqüente, provavelmente

devido a diferenças sutis entre os dois microclimas, as demais espécies não mostraram semelhante distribuição.

Essas diferenças já haviam sido detectadas por Barretto⁴: “Em um mesmo lugar (casa, abrigo de animais, armadilha ou posto de captura) a incidência dos flebotomos varia consideravelmente com as condições atmosféricas. Todas as causas que prejudicam a atividade dos flebotomos, tais como, quedas da temperatura, pequeno grau higrométrico do ar, ventos, chuvas, etc., fazem diminuir a incidência de flebotomos em um dado ponto... Mas, ainda que as condições atmosféricas sejam aparentemente idênticas, a incidência dos flebotomos varia inexplicavelmente de um dia para outro, em um mesmo lugar...”. A relação macho/fêmea de 1:2,9 pode indicar maior atratividade dessas armadilhas para as fêmeas.

L. ayrozai é uma espécie comum em ambiente de mata, tanto ao nível do solo quanto em copa de árvore. Aguiar *et alii*¹ já haviam constatado que essa espécie apresenta tendência a sugar as partes baixas do corpo, em iscas humanas a nível do solo e citam o encontro de Arias & Freitas (1977) em luminosos em copa de árvore, assim como ocorreu em nossas investigações (Figura 3).

As armadilhas luminosas instaladas nos diferentes ecótopos no interior de mata revelam que *L. migonei* foi a espécie que compareceu em maior número no recinto com roedores. *L. ayrozai*, por sua vez, foi a espécie mais freqüente (53,61%), principalmente, nos ecótopos com cão, galinha e hamsters, conforme Aguiar *et alii*² já haviam observado na floresta do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ.

No total, foram obtidos 60 machos e 146 fêmeas das diferentes espécies, dando uma razão entre sexos de 1: ,43.

O ecótopo com o cão foi o que apresentou o melhor rendimento, com 56 (28,14%) dos flebotômíneos coletados, a este seguem: roedores (24,62%), hamsters (19,60%), galinhas (15,58%) e, finalmente marsupiais (12,56%).

Das espécies predominantes, 71,8% dos exemplares de *L. fischeri* foram obtidos junto aos hamsters e roedores silvestres; 57,58% de *L. migonei* junto aos roedores silvestres; 47,66% de *L. ayrozai* no ecótopo com cães, apresentando diferenças significativas ($\chi^2= 17,03$, $\chi^2= 26,00$ e $\chi^2= 53,61$, respectivamente) entre os flebotômíneos coletados nas diferentes iscas. *L. intermedia s.l.* compareceu com inexpressivos 10,05% neste tipo de ambiente silvestre.

L. migonei, embora adaptada a ambientes modificados, também foi capturada em ambiente de mata. Alguns autores referem-se à cianofilia dessa espécie em coletas no peridomicílio, ressaltando, inclusive, sua possível participação na cadeia de transmissão de leishmaniose tegumentar canina em Vargem Grande, RJ, outros à cianofilia de *L. migonei* em floresta, fato não observado neste estudo (Falqueto⁸; Sessa *et alii*²⁴, Rangel *et alii*²²).

As capturas com papel embebido em vaselina líquida, provavelmente, são as que indicam mais fielmente a atratividade exercida pelas iscas, tendo-se em vista que nas demais técnicas empregadas, a luz funciona como reconhecido estímulo atrativo.

Embora em pequeno número, a captura de *L. fischeri* exclusivamente no ecótopo com galinhas parece indicar certa predileção por essa isca, como foi assinalado por Falqueto⁸ e também por Aguiar *et alii*³. Portanto, essa espécie estaria buscando outra fonte que não o mamífero, tornando difícil imaginar a manutenção de um ciclo enzoótico de (*Leishmania (V.) braziliensis*).

Taniguchi *et alii*²⁶ encontraram situação semelhante, nesse mesmo município, em uma investigação envolvendo galinheiro construído em margem de mata, onde observaram domínio absoluto (74,78%) de *L. fischeri*, em relação a outros flebotômíneos, junto às galinhas, em margem de mata.

Embora nossas investigações não tenham revelado maior afinidade de *L. fischeri* por roedores, Gomes¹⁶ encontra uma discreta associação entre ambos, o que o faz pensar em uma suspeita desse flebotômíneo ter algum papel importante na enzootia da leishmaniose regional.

Já, *L. migonei* presente no ecótopo com galinhas, também foi encontrado naquele onde se encontravam os hamsters, parecendo demonstrar certo ecletismo para a fonte alimentar.

No ecótopo com roedores, não se obteve nenhum exemplar de flebotômíneos, entretanto o galinheiro foi responsável por 56,86% dos insetos coletados no papel embebido com vaselina líquida.

O valor desse tipo de coleta é atribuído a não interferência humana (capturador) e nem de isca luminosa (armadilha luminosa), embora pouca rendosa, reflete com maior fidelidade, o poder de atração de determinada isca animal para os flebotômíneos.

Nas capturas com pano branco (Tabela 5) houve diferença significativa ($\chi^2= 70,09$) em relação aos insetos coletados nas diferentes iscas, tendo *L. ayrozai* predominado no ecótopo com galinhas e com hamsters, esses ecótopos foram os que apresentaram o melhor rendimento totalizando 61,79% dos flebotômíneos coletados no pano.

Cão e galinha atraíram 60,78% dos exemplares de *L. fischeri* coletados por esse método. *L. migonei* foi atraído igualmente pelos roedores silvestres (28,57%), hamsters (28,57%) e galinhas (28,57%). *L. ayrozai*, espécie mais freqüente nesse estrato, foi coletado em maior número no recinto com hamsters (35,87%) e no galinheiro (34,78%), contribuindo os recintos com cães (12,50%), roedores silvestres (8,79%) e gambás (8,15) do total dessa espécie.

Dos 272 exemplares coletados, 52 machos e 220 fêmeas, mostrando a relação macho e fêmea da ordem de 1:4,2. Essa diferença pode ser explicada em função da menor atividade das fêmeas após o repasto, tornando-as iscas fáceis de captura ou pelo fato dessas coletas terem sido no período noturno, quando a atividade destes insetos é maior à procura de repasto sanguíneo, ocasião em que os capturamos, conforme verificou Barretto⁴, em 1943.

O encontro de fêmeas em maior número que os machos diferem de achados de outros autores. No nosso experimento, observou-se que machos superaram as fêmeas, apenas em

coletas com papel embebido com vaselina líquida, nos demais tipos de coletas, as fêmeas encontram-se em superioridade numérica^{9,16,17}.

A análise das coletas com luminosos, apenas em interior de mata, revelou que cães, galinhas e hamsters atraíram, significativamente, *L. ayrozai* ($\chi^2=130,60$; $\chi^2=27,52$ e $\chi^2=11,97$, respectivamente) em relação às outras espécies de flebotômíneos presentes nesse ambiente (Tabela 8), não conferindo à nenhuma dessas iscas o papel de fonte sanguínea preferencial. Gomes *et alii*¹⁹ já haviam observado que em área florestada no Vale do Ribeira, nenhuma espécie de flebotômíneo demonstrou hábito cianofílico.

O mesmo tipo de análise foi feito considerando-se coletas com papel embebido em vaselina líquida.

Nessa modalidade de coleta, também, verificou-se que o tipo de isca não interferiu no conjunto das espécies coletadas, mas na análise da espécie por ecótopo, ressalta-se que naquele com galinhas, *L. migonei* e *L. fischeri* foram mais frequentes ($\chi^2=21,90$) em relação às outras espécies. Nossos resultados diferem daqueles obtidos por Falqueto⁸ em armadilhas de Disney com isca de cão, instalado em interior de mata, naquela investigação, o autor observou que o cão atraiu intensamente *L. intermedia s.l.*, *L. migonei*, *L. whitmani* e *L. fischeri*. Em nossas observações, nenhuma espécie de flebotômíneos compareceu, a níveis significativos, no ecótopo com cão.

Nas coletas com pano estendido nas paredes dos recintos, *L. ayrozai* foi a espécie mais frequente naqueles com cão, gambá, galinha e hamsters ao longo do período, ressalta-se que em 1996, *L. fischeri* prevaleceu no canil ($\chi^2=13,24$) (Tabela 5).

Esses encontros são concordantes com as afirmativas de vários autores que consideram o uso de iscas animais como indicativos de afinidades hematofágicas, em que as preferências alimentares dizem respeito à disponibilidade de fonte sanguínea, à variedade da flora e fauna dos locais investigados, às diferenças geográficas que poderiam implicar nas preferências alimentares dos flebotômíneos ou ainda, do ecletismo alimentar dos flebotômíneos, fazendo uso da fonte disponível^{11, 18, 25}.

A região do Vale do Ribeira sofreu, no início dos anos de 96 e 97, grande inundação pelo transbordamento do rio Ribeira de Iguape, decorrentes de precipitações elevadas conforme pode-se observar na figura 1. Provavelmente em função desse episódio, aliado ao “fenômeno *El Nino*” que acometeu o continente americano naquele período, as coletas tenham sido pouco rendosas. Os prováveis criadouros tenham sido, parcialmente, danificados pela ação das águas.

Nesse período as temperaturas máximas oscilaram entre 27,2° e 41,0° C enquanto as mínimas variaram de 7,0° a 21,0° C; a umidade relativa manteve-se entre 82 e 92%, esse fator parece não ter afetado na distribuição dos flebotômíneos.

De qualquer forma, o produto das coletas revelou que as espécies mais frequentes como *L. intermedia s.l.*, *L. migonei*, *L. fischeri* e *L. ayrozai* predominaram nos períodos mais secos do ano (abril a agosto) o que corrobora os achados de Gomes¹⁵,

no Vale do Ribeira.

Em 1996, e em 1997, as coletas em interior de mata tiveram predomínio de *L. ayrozai*, em particular no período pós-chuva, de abril a junho, superando, em número, o conjunto de todas as demais espécies. Esse período foi responsável por 65,63% de todos os exemplares coletados, revelando que houve diferença significativa entre as coletas nos meses trabalhados ($\chi^2=714,76$).

Esses resultados encontram eco nas investigações de Gomes¹⁵, que estudando a biologia de *L. intermedia s.l.* no Vale do Ribeira, confirma a dispersão ubiqüitária dessa espécie, com predomínio absoluto em ambientes abertos e de margem de mata, onde a ação humana se fez presente. Nossos resultados concordam quanto à distribuição sazonal dessa espécie, ausente em períodos com altos índices pluviométricos, com maiores densidades verificadas no outono e inverno, aproximadamente 40 dias após o término das chuvas. As explosões de alados podem ser explicadas pela não destruição total dos criadouros pelas águas.

Ainda no Vale do Ribeira, Domingos *et alii*⁷, concluem que *L. intermedia s.l.*, embora de forma irregular, está presente ao longo do ano, com picos no verão e inverno, antes ou após o período de chuvas.

As pequenas variações encontradas na distribuição sazonal das espécies mais frequentes, talvez *estejam fortemente influenciadas por fatores locais, especialmente relacionados às condições micro e macroclimáticas*, conforme afirma Gomes¹⁶.

Na Região do Planalto, em Itupeva, SP, *L. intermedia s.l.*, *L. whitmani*, *L. fischeri*, *L. migonei* e *L. pessoai*, também apresentaram variação sazonal concordante com os períodos mais secos do ano (Mayo *et alii*²¹).

Em outras regiões do Estado ou do país, ocorreram variações em relação à atividade sazonal das principais espécies, embora sem analisar estatisticamente os valores locais de umidade relativa, temperatura ou índice pluviométrico, pode-se inferir que essas diferenças estejam relacionadas com as variações climáticas e paisagísticas locais. Assim, em Teodoro Sampaio, no Estado São Paulo, Forattini¹⁰ verificou que nos meses mais frios e secos (junho-agosto) havia queda na densidade de *L. whitmani* e *L. intermedia s.l.* retornando aos índices mais elevados nos meses mais quentes e úmidos (dezembro-fevereiro), fato semelhante foi observado por Barretto⁴ em estudos no Estado de São Paulo e por Condino *et alii*⁵, quase sessenta anos após o primeiro inquérito.

No Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, as espécies acrodendrófilas revelam maior atividade nos meses frios e secos e maior presença de *L. ayrozai* ao nível do solo nos meses quentes e úmidos. (Aguiar *et alii*¹).

Teodoro *et alii*²⁸, no norte do Paraná, relatam maior atividade nos meses mais quentes e úmidos.

Em habitats antrópicos no município de Jussara, Paraná, Teodoro²⁷, também relata a ocorrência da maior atividade de *L. intermedia*, *L. whitmani*, *L. pessoai*, *L. fischeri* e *L. migonei* nas épocas de temperatura e índice pluviométrico mais

Taniguchi, H. H. et al. Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e frequência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):103-112, 2002

acentuadas, obtendo 83,38% dos exemplares no verão e outono. Todavia em Corguinho, MS, o pico de atividade de *L. whitmani* coincide com o inverno (Galati *et alli*¹³)

Em área urbana de Corumbá, Mato Grosso do Sul, *L. cruzi*, espécie sugestiva de participação na transmissão de leishmaniose visceral na localidade, pela sua predominância no peri e intradomicílio, cerca de 90,0% das espécies coletadas, apresenta picos no verão, outono e primavera (Galati *et alii*¹⁴).

CONCLUSÕES

1. A fauna flebotomínica no município de Eldorado esteve representada por 10 espécies: *L. intermedia s.l.*; *L. fischeri*, *L. migonei*; *L. ayrozai*; *L. monticola*; *L. ferreirana*, *L. pestanai*, *L. edwardsi*; *L. firmatoi* e *B. troglodytes*.
2. No interior de mata verificou-se acentuada presença

de *L. ayrozai*, seguido por *L. fischeri*, *L. migonei*, *L. intermedia s.l.*, constituindo-se as espécies predominantes nesse ambiente.

3. *L. ayrozai* manteve maior atividade nos meses de abril a julho, períodos mais secos.
4. A presença de iscas animais não interferiu na variedade das espécies de flebotomíneos coletados. Verificou-se que em interior de mata houve predomínio de *L. ayrozai*.
5. A presença marcante de *L. ayrozai*, no ambiente florestal, restrita ao ambiente não modificado ou pouco modificado, confere a essa espécie condições potenciais para o papel de vetor na hipótese da existência de ciclos silvestres de circulação de *Leishmania* nessa Região.
6. A predominância de *L. ayrozai* nos ecótopos com roedores, sugere a participação desses flebotomíneos no ciclo silvestre de *Leishmania* sp, no município de Eldorado.

RIALA6/925

Taniguchi, H. H. et al - Sandfly ecological observations in Eldorado County, Ribeira Valley, São Paulo State, Brasil, an endemic area of American Cutaneous Leishmaniasis. Period between 1996 and 1997. I – Sazonality and frequency of *Lutzomyia ayrozai* to different ecotopes with sentinel animals in forest environment. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):103-112, 2002.

ABSTRACT. Observations were made in periurban area in Eldorado county, Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil for the purpose of assessing the participation of phlebotomines, domestic, domiciliar and wild animals in the epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis. Several artificial ecotopes were installed within the forest for the capture of phlebotomines between January 1996 and December 1997. Ten sandfly species represented by 1,066 specimens were captured during this period. *Lutzomyia ayrozai* was predominant in the forest. The greatest peak occurred from April to July. *Lu. ayrozai* could be an important vector in enzootic cycle of *Leishmania* in this region.

KEY WORDS. American Cutaneous Leishmaniasis, ecology, vectors, *L. ayrozai*, Phlebotomine, animal bait, Vale do Ribeira

REFERÊNCIAS

1. Aguiar, G.M. et al. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. II - Distribuição vertical (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 80(2): 187-194, 1985a.
2. Aguiar, G.M.; Vilela, M.L.; Lima, R.B. Ecology of the sandflies of Itaguai, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera; Psychodidae; Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82(4): 583-584, 1987.
3. Aguiar, G.M.; Vilela, M.L.; Soucasaux, T. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. V - Preferências alimentares (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 81(4): 477- 479, 1986.
4. Barretto, M.P. **Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae).** São Paulo, 1943. [Tese de Concurso de Docência Livre - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
5. Condino, M.L.F. et al. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região Sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31(4): 355-360, 1998.
6. Domingos, M. F. – **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1981 a 1995.** São Paulo, 1997. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]
7. Domingos, M.F. et al. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, Região Sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31(5): 425-432, 1998.
8. Falqueto, A. **Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo, Brasil.** Rio de Janeiro, 1995. [Tese de Doutorado - Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz].
9. Forattini, O.P. Algumas observações sobre a biologia de flebotomos em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). **Arq. Fac. Hig. S. Públ. USP**, 8: 15-36, 1954.

Taniguchi, H. H. et al. Observações ecológicas de flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I – Sazonalidade e frequência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):103-112, 2002

10. Forattini, O.P. Novas observações sobre a biologia dos flebotômíneos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). **Arq. Hig. Saúde Pública**, 24(82): 209-215, 1960.
11. Forattini, O.P. **Entomologia Médica**, 4º vol., Ed. Edgar Blucher-EDUSP, São Paulo, 1973.
12. Forattini, O.P.; Oliveira, O. Focus of cutaneous leishmaniasis in a area of south of the State of São Paulo, Brazil. **Arch. Fac. Hig. Saúde Públ. Univ. S. Paulo**, 11: 23-34, 1957.
13. Galati E.A.B. et al. Estudo dos flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 30(2): 115-28, 1996.
14. Galati, E.A.B. et al. Estudo de flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 31(4): 379-90, 1997.
15. GOMES, A.C. **Observações ecológicas sobre *Psychodopygus intermedius* no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil.** São Paulo, 1979 [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].
16. Gomes, A.C. **Aspectos epidemiológicos sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil.** São Paulo, 1985 [Tese de Livre-Docência – Faculdade de Saúde Pública da USP].
17. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1 - Estudo experimental da frequência de flebotômíneos à ecótopos artificiais com referência especial à *Psychodopygus intermedius*. **Rev. Saúde Públ.**, 14: 540-556, 1980.
18. Gomes, A.C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. **Rev. Saúde Pública**, 17: 23-30, 1983.
19. Gomes, A. C. et al. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8 – Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 32(2): 105-115, 1990.
20. Lepsch, I.F et al. Macrozoneamento das terras da região do Rio Ribeira de Iguape, SP. **Bol. Cient. Inst. Agron. Campinas**, 19:1-181, 1990.
21. Mayo, R.C. et al. Flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, 31(4): 339-345, 1998.
22. Rangel, E.F. et al. Flebotomos de Vargem Grande, foco de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 81(3): 347-349, 1986.
23. Rocha E Silva, E.O. et al. A leishmaniose tegumentar americana no litoral sul do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, 32: 9-25, 1980.
24. Sessa, P.A et al. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Espírito Santo – Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 18(4): 237-241, 1985.
25. Sherlock, I. A. Há especificidade dos flebotômíneos para as leishmânias? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30(Supl. 1): 151, 1997.
26. Taniguchi, H.H. et al. Leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. V – Estudos sobre a colonização de flebotômíneos em áreas endêmicas. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, 86(Supl. 1): 255, 1991.
27. Teodoro, U. – **Características ecológicas de flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) em habitats antrópicos, município de Jussara, Paraná, Brasil.** Paraná, 1995 [Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná].
28. Teodoro, U. et al. Observações sobre o comportamento de flebotômíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 27(4): 242-249, 1993.
29. Tolezano, J.E.; Macoris, S.A.G.; Diniz, J.M.P. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 40: 49-54, 1980.

Recebido em 18/04/2002; Aprovado em 05/12/2002

Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica

Presence of yeasts in the mucosae and feces of apparently healthy
individuals and subjects with symptoms of fungal infection

Jaqueline Otero SILVA^{1*}
Silvio Antônio FRANCESCHINI²
Regina Célia CANDIDO³

RIALA6/926

Silva, J. O., Franceschini, S. A.; Candido, R. C. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):113-120, 2002

RESUMO. As leveduras estão amplamente distribuídas no ambiente sendo também habitantes normais do corpo humano. São consideradas patógenas oportunistas causando infecções que variam desde superficiais até profundas e fatais. O conhecimento da microbiota normal pode ajudar o médico a ter perspectiva sobre uma possível fonte e a importância de microrganismos isolados de infecções. O estudo teve como objetivo verificar a presença de leveduras em amostras de mucosas bucal, vaginal, anal e de fezes de indivíduos aparentemente saudáveis ou que apresentavam algum sintoma de infecção fúngica. Foram utilizados para isolamento os meios de ágar Sabouraud cloranfenicol, Biggy agar, CHROM agar Candida e Pagano Levin agar. Isolou-se leveduras em 40.7% (35/86) das amostras bucais, 26.2% (11/42) das amostras vaginais de pacientes assintomáticos, 44.8% (13/29) das amostras vaginais provenientes de mulheres com desconforto vaginal, 34.6% (9/26) das amostras anais, 77.5% (31/40) das amostras de fezes. *C. albicans* foi a espécie prevalente em todos os tipos de amostras. As fezes apresentaram diversidade de espécies representadas pelos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, e *Hansenula* atualmente, *Pichia*.

PALAVRAS - CHAVE. *Candida albicans*, leveduras, fezes, microbiota, mucosas.

¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Ribeirão Preto, São Paulo e Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade do Estado de São Paulo – UNESP

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SISUSP

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo;

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto, Rua Minas, 877, CEP 14 085-410, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil - Telefone: (0xx)16-6255046; Fax (0xx)16-6357994

INTRODUÇÃO

As leveduras são ubíquas no meio ambiente, sendo encontradas no solo, na água, nos vegetais e como habitantes do corpo humano, fazendo parte da microbiota normal endógena. Podem estar presentes em espécimes clínicos, como resultado de contaminação ambiental, colonização ou processo infeccioso. Portanto, o significado de sua presença em material biológico depende do número de amostras positivas com o mesmo organismo em um mesmo paciente, do número de colônias formadas e se o material é proveniente de sítios estéreis ou não^{26,44}.

Por fazer parte da microbiota humana, as leveduras são consideradas patógenas oportunistas e podem causar muitos processos infecciosos que variam desde quadros clínicos benignos ou assintomáticos até aqueles graves e fatais. Estas infecções não têm limitação geográfica porque ocorrem principalmente em pacientes com predisposição a elas. Os principais fatores envolvidos são: desajuste hormonal, uso de imunossupressivos ou antimicrobianos de amplo espectro por períodos prolongados, uso de cateter venoso, alimentação parenteral e doenças como diabetes mellitus, neoplasias, leucemias, AIDS e outras que causam diminuição do sistema imunológico^{4,10,45}.

Entre as leveduras, os gêneros de maior importância médica são: *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula* atualmente, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Trichosporon*.

Segundo Kurtzman e Fell²¹, são descritas 163 espécies do gênero *Candida* das quais cerca de 20 já foram associadas a processos infecciosos.

Estas espécies e, principalmente, *C. albicans* vivem normalmente na orofaringe, secreção brônquica, vagina, urina, fezes colonizando o trato respiratório, geniturinário e gastrointestinal^{22,34}.

A incidência de infecções mistas por múltiplas espécies de leveduras está crescendo, principalmente devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos e ao uso de antimicrobianos de amplo espectro^{11,15,40}. Embora *C. albicans* continue sendo a levedura mais freqüentemente envolvida nos processos patológicos, a emergência de outras espécies tem sido claramente evidenciada. Vários autores têm relatado um aumento no número de infecções devido a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e outras^{2,14,23,28,31,45}.

O conhecimento da microbiota normal de qualquer parte do organismo ajuda o médico a ter perspectiva sobre a possível fonte e importância de microrganismos isolados de infecções clínicas. Um exemplo é a identificação de microrganismos de fontes exógenas ou endógenas ao homem, para estudos de infecções hospitalares^{12,41}.

Atualmente, nos EUA, o gênero *Candida* é reconhecido como o quarto patógeno responsável por infecção sistêmica hospitalar, com taxa de mortalidade entre 55 a 70%^{5,32,33}.

O objetivo deste estudo foi verificar a presença de

leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis ou não através da utilização de quatro meios seletivos para leveduras.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Pacientes e amostras biológicas

No período de maio de 1999 a setembro de 2000 foram colhidas 223 amostras biológicas provenientes das mucosas da boca (86), da vagina (71), do ânus (26) e fezes (40) de 86 pessoas incluindo pacientes atendidos pelo Sistema Integrado de Saúde da USP e de voluntários ao trabalho representados por universitários, funcionários da saúde e pessoas diretamente ligadas a eles. Todos tinham idade acima de 21 anos, do sexo masculino ou feminino, aparentemente saudáveis ou apresentando alguma sintomatologia para infecção fúngica. Os mesmos receberam explicação acerca da investigação e consentiram na sua inclusão na pesquisa, preenchendo um protocolo de permissão e avaliação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz Central - São Paulo.

As amostras das mucosas foram coletadas por "swabs" esterilizados, e imediatamente introduzidos em tubos contendo 1 mL de solução fisiológica. As amostras de fezes foram colhidas em frascos plásticos esterilizados comercializados para cultura e diluídas na proporção de 1g para 5 mL de solução fisiológica esterilizada.

2. Leveduras: isolamento e identificação

As suspensões das amostras de fezes e dos conteúdos vaginais, orais e anais foram homogeneizadas em vortex. Volumes de 100 mL das respectivas amostras foram semeados por espalhamento em várias direções nas placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: ágar Sabouraud dextrose (Difco) acrescido de cloranfenicol 100 mg/L, CHROMagar *Candida* (Probac), Pagano Levin agar (Difco) e Biggy agar (Difco). Após incubação a 30°C por 72 horas um exemplar de cada variante colonial foi repicado em tubo com ágar Sabouraud dextrose para manutenção e posterior identificação. Esta foi baseada nas provas de filamentação; produção de tubo germinativo, ascosporos, urease e fenoloxidase; zimograma, auxanograma, crescimento em diferentes temperaturas de incubação como recomendado por Kurtzman e Fell²¹. Utilizou-se também o sistema de identificação comercial API 20C AUX (bioMérieux). As placas foram reincubadas por até 7 dias para favorecer o crescimento de leveduras fastidiosas.

RESULTADOS

Das 86 pessoas investigadas, 57 não apresentavam qualquer sintomatologia para infecção e 29 mulheres queixavam-se de desconforto vaginal como ardor, prurido, odor fétido ou corrimento.

Tabela 1. Isolamento de leveduras de diferentes materiais biológicos

Material biológico e Grupo de pacientes	Culturas positivas		Nº de amostras contendo várias leveduras associadas (x)		
	n / N	%	x=2	x=3	x=4 ou mais
Mucosa bucal: Sem prótese dentária + não fumantes	22 / 64	34,4%	2	1	-
Com prótese dentária + não fumantes	8 / 14	57,1%	-	-	-
Sem prótese dentária + fumantes	5 / 8	62,5%	1	-	-
Com prótese dentária + fumantes	0 / 0	0%	-	-	-
Mucosa vaginal:					
Assintomáticas	11 (42)	26,2%	3	-	-
Sintomáticas	13 (29)	44,8%	2	-	-
Mucosa anal: Assintomáticas	9 (26)	34,6%	4	1	-
Fezes:					
Assintomáticos	31 (40)	77,5%	15	6	2

n / N = nº de amostras positivas / nº total de amostras

Foram isoladas leveduras em 40,7% (35/86) das amostras bucais; 26,2% (11/42) das amostras vaginais de mulheres assintomáticas; 44,8% (13/29) das amostras vaginais de pacientes que apresentaram desconforto vaginal; 34,6% (9/26) das amostras anais; 77,5% (31/40) das amostras de fezes (Tabela 1).

Entre as culturas de amostras da cavidade bucal obteve-se isolamento de uma a três espécies de leveduras, conforme apresentado na Tabela 1. *C. albicans* foi a espécie prevalente em culturas monomicrobianas (uma espécie de levedura) e polimicrobianas (duas ou mais espécies de leveduras) conforme demonstram as Tabelas 1 e 2.

De 24 amostras vaginais com culturas positivas provenientes de pessoas sintomáticas ou não, 19 (79,2%) apresentaram culturas monomicrobianas enquanto que em 5 (20,8%) foram isoladas duas espécies (Tabela 1). *C. albicans* foi a espécie prevalente tanto para pessoas sintomáticas como assintomáticas (Tabelas 2 e 3).

Nas culturas de fezes predominou o isolamento com mais de uma espécie de leveduras (74,2%), sendo encontrado culturas monomicrobianas em 25,8%. Entre as culturas de amostras anais observou-se o isolamento de um tipo de levedura em 44,6% (4/9) e o isolamento de duas espécies em 55,6% (5/9) conforme apresentado na Tabela 1.

As Tabelas 2 e 3 exibem as espécies isoladas nos diferentes materiais biológicos. Em amostras de fezes observou-se oito espécies do gênero *Candida* além dos gêneros *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Hansenula*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O ser humano pode ser portador de leveduras, principalmente do gênero *Candida*^{18,22,44}. Contudo, a prevalência das espécies nos diferentes sítios anatômicos depende do tipo de amostra clínica investigada, da metodologia utilizada no processo de isolamento, assim como dos diversos grupos populacionais, o que dificulta as comparações entre os diferentes estudos^{25,44}.

A natureza comensal de *Candida* sp enfatiza a forma oportunista da candidose oral⁴⁴. A literatura relata 30 a 65% da incidência de leveduras na cavidade oral, sem evidência de infecção^{1,3,29}. Diversas *Candida* sp têm sido isoladas como comensais na cavidade bucal, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*^{7,24}.

Entre as amostras clínicas investigadas neste trabalho, foram obtidos 40,7% de culturas positivas para leveduras em secreção de cavidade bucal, sendo *C. albicans* isolada na maioria das ocasiões (Tabelas 1 e 2). Resultados estes pertinentes com a literatura citada.

Nenhum paciente apresentou alterações na cavidade bucal, e as leveduras isoladas foram consideradas comensais. No entanto, ao avaliar as fichas dos pacientes, observou-se que 14 deles faziam uso de próteses dentárias totais ou não sendo todos não fumantes (Tabela 1). O uso de prótese total é um importante fator que favorece a colonização de leveduras^{1,3,7,20}. Na exclusão desses pacientes, verificou-se uma taxa de 34,4% (22/64) de pessoas saudáveis e colonizadas por leveduras.

Tabela 2. Espécies de leveduras isoladas em culturas monomicrobianas nos diferentes materiais biológicos.

Espécie	Amostras biológicas						Número total de amostras positivas (%)	
	Mucosa bucal ^a		Mucosa vaginal		Mucosa anal ^b	Fezes ^b		
	Sem prótese e não fumantes	Com prótese e não fumantes	Sem prótese e fumantes	assintomáticas	sintomáticas			
<i>Candida albicans</i>	15	7	2	7	8	1	4	44 (68,7%)
<i>Candida parapsilosis</i>	3			1		1	1	6 (9,4%)
<i>Candida glabrata</i>					2	2		4 (6,2%)
<i>Candida tropicalis</i>		1						1 (1,6%)
<i>Candida guilliermondii</i>					1			1 (1,6%)
<i>Candida fabianii</i>						1		1 (1,6%)
<i>Rhodotorula rubra</i>	1		1	1	1		1	5 (7,7%)
<i>Rhodotorula minuta</i>			1					1 (1,6%)
<i>Trichosporon</i> sp							1	1 (1,6%)
TOTAL	19	8	4	9	12	5	7	64 (100%)

^a Não houve amostras de pacientes com prótese dentária e fumante; ^b pessoas assintomáticas

Tabela 3. Isolamento de mais de uma espécie de levedura em culturas em diferentes materiais biológicos.

Combinações de espécies	Amostras biológicas			Total*
	Bucal	Vaginal	Anal ^d	
<i>C. albicans</i> + <i>R. rubra</i>	1 ^a		1	2
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>	1 ^b			2
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>		1 ^c		1
<i>C. albicans</i> + <i>T. inkin</i>		2 ^c		2
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>			1	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. guilliermondii</i>		1 ^c		1
<i>C. albicans</i> + <i>C. fabiani</i>			1	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>				1
<i>C. albicans</i> + <i>C. guilliermondii</i> + <i>R. rubra</i>	1 ^a			1
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>R. rubra</i>				1
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C. bombi</i>				1
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>S. cerevisae</i>				1
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C. krusei</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>R. rubra</i> + <i>T. mucoides</i>				1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. rugosa</i> + <i>H. anomala</i>				1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>R. rubra</i>				2
<i>C. parapsilosis</i> + <i>T. inkin</i>			1	1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. guilliermondii</i>	1 ^a	1 ^d		2
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. zeylanoides</i>				1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>R. rubra</i> + <i>T. inkin</i>			1	1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. krusei</i> + <i>T. asahii</i>				1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>R. rubra</i> + <i>S. cerevisae</i> + <i>T. inkin</i>				1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>R. rubra</i> + <i>C. albidus</i> ^e				1
<i>C. krusei</i> + <i>T. inkin</i> + <i>S. cerevisae</i>				1
<i>C. krusei</i> + <i>C. zeylanoides</i>				1
<i>C. krusei</i> + <i>R. rubra</i>				1
<i>C. glabrata</i> + <i>T. mucoides</i>				1
<i>T. asahii</i> + <i>R. rubra</i>				1

Amostras biológicas de pacientes: ^asem prótese dentária e não fumante, ^b sem prótese dentária e fumante, ^c sintomática,

^dassintomática; ^e *Cryptococcus albidus*

* número total de amostras positivas

Este resultado foi próximo aos de Wray et al.⁴⁶ e Jorge et al.²⁰, de 35 a 37,4%. Porém, inferior a outros autores que observaram de 47% a 52%^{3,9,30}. Estas diferenças provavelmente aconteceram, devido ao tipo de população atendida na presente pesquisa, que constituía-se de pessoas com bons hábitos de higiene bucal e na sua maioria não fumantes (64/72) conforme demonstra a Tabela 1.

Oito dos 14 usuários de prótese (57,1%) foram colonizados por leveduras. Considerando que esses pacientes não apresentavam manifestações clínicas e não eram fumantes, isto contribui com a idéia de que apenas a presença do microrganismo não determina a doença e sim a somatória de vários fatores relacionados ao fungo tais como produção de enzimas, adesão, dimorfismo, produção de toxinas e principalmente aos ligados á defesa do hospedeiro^{3,35}.

Foram observadas culturas mistas em quatro amostras da cavidade bucal com diferentes combinações de espécies

(Tabela 3). Culturas de amostras bucais com duas espécies ou mais também foram observadas por outros autores^{8,42} no entanto, os dados da presente pesquisa divergiu de Candido et al.⁴² que encontraram *C. tropicalis* na maioria das associações.

O isolamento de *C. albicans* em secreções vaginais não implica, necessariamente, em quadro patológico, sendo de aproximadamente 30% a frequência desta em mulheres normais^{22,26,36}. No presente estudo encontrou-se 26,2% de culturas positivas neste grupo de pacientes estando de acordo com a literatura citada.

Os fungos dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* podem ser isolados da vagina humana^{18,27,37}.

No presente trabalho, verificou-se uma predominância de *C. albicans* em ambos os grupos de pacientes (assintomáticas e sintomáticas). Segundo vários autores, esta espécie é isolada em mais de 80% dos pacientes assintomáticas ou não^{28,38,39}.

É importante ressaltar que *C. glabrata* foi isolada somente em amostras de pacientes sintomáticas. Esta espécie tem sido relatada como agente de infecções vaginais por Geiger et al.¹⁶, Hurley et al.¹⁹, porém tem sido também isolada de pessoas saudáveis^{25,27}. Em cinco ocasiões foram detectadas culturas com mais de uma espécie de levedura demonstrando a possibilidade de culturas mistas neste tipo de material²⁷. As associações foram distintas para cada paciente conforme demonstra a Tabela 3. Moura²⁷ também relatou associações de leveduras em culturas de secreção vaginal em pacientes com sintomatologia e encontrou uma predominância na combinação entre *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Candido et al.⁸ obtiveram de 23 pacientes, duas culturas mistas de amostras vaginais, sendo observada as associações entre *C. albicans* e *C. tropicalis*, *R. rubra* e *C. tropicalis*.

Devido a natureza comensal, algumas controvérsias têm ocorrido quanto à interpretação de resultados de culturas positivas para leveduras em amostras vaginais. Tradicionalmente, qualquer crescimento de leveduras do gênero *Candida* era considerado achados patogênicos neste sítio anatômico⁶. No entanto, alguns autores têm relacionado a presença de sintomas à quantidade de leveduras presentes na vagina^{18,28,38}.

Odds et al.²⁸ correlacionaram a concentração de *Candida* na vagina com os sinais e sintomas de candidose vaginal. Entre 106 mulheres abrigoando leveduras na vagina, sem outra causa patológica genital presente, os autores encontraram uma associação significativa entre a quantidade de leveduras em indivíduos com sintomas de prurido e corrimento vaginal anormal. Não foram observadas diferenças entre o número de leveduras vaginais e o uso de contraceptivo oral e antibióticos ou o estágio do ciclo menstrual. O prurido e o corrimento vaginal foram portanto, fortes indicadores de infecção por *Candida*.

Hopwood et al.¹⁷ consideraram um número acima de 10 colônias de leveduras, isoladas de “swab” vaginal, como critério para diagnóstico.

Considerando as 29 pacientes com queixa de ardor, corrimento, prurido, irritação e odor fétido, obteve-se culturas positivas em 44,8% (13), sendo que, destas, 11 apresentaram em média contagens superiores a 10 unidades formadoras de colônias. A presença de leveduras em pacientes assintomáticas ocorreu em 26,2%, sendo que a maioria delas (7/10) apresentaram contagem inferior a 10 colônias.

Apesar da amostragem ser pequena, os dados demonstraram claramente a importância da contagem de leveduras em secreções vaginais. Segundo Odds et al.²⁸, amostras colhidas com “swabs” não são ideais para análise quantitativa, porém eles consideram uma metodologia razoável para uma análise semi-quantitativa.

Essencialmente, todas as áreas do trato gastrointestinal humano podem abrigar espécies de *Candida*. Em indivíduos saudáveis são relatados índices de 80%⁴⁴.

Alguns trabalhos correlacionaram a presença de fungos, especialmente leveduras e casos de diarreia em humanos. As

diarreias por leveduras podem ocorrer especialmente em crianças, quando nenhuma outra espécie patogênica for encontrada e o número de leveduras for significativo, seguido de falha na terapia antibacteriana e sucesso com drogas antimicóticas^{13,43}.

Em fezes, *C. albicans* tem sido predominante em vários grupos incluindo recém nascidos, crianças com e sem diarreia, adultos saudáveis ou com alguma anormalidade e em pacientes HIV positivos^{13,42}.

No presente trabalho foram obtidas culturas positivas para leveduras em 77,5% (31/40) das amostras de fezes analisadas. A elevada frequência no isolamento de leveduras deve-se provavelmente a utilização de quatro meios de cultura no isolamento primário.

Fezes apresentou uma microbiota diversificada de leveduras representadas pelos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Hansenula*, sendo predominantes *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Tabelas 2 e 3). Estes dados estão de acordo com Tallero et al.⁴², que detectaram em 2.221 amostras de fezes, as mesmas espécies inclusive as menos frequentes, *Cryptococcus albidus* e *Candida rugosa* com predominância de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. No entanto, a presente pesquisa encontrou 74,2% de culturas mistas por leveduras (Tabelas 1 e 3) divergindo dos autores acima que encontraram 35%. Esta divergência pode ser ocorrido devido a população estudada, bem como a metodologia utilizada, uma vez que os mesmos utilizaram apenas ágar Sabouraud como meio seletivo para leveduras no isolamento primário.

Considerando que o intestino age como reservatório de leveduras, com grande potencial de colonizar a pele da região perianal, foram colhidas amostras de 26 pacientes aparentemente normais. Obteve-se 34,6% de culturas positivas para leveduras com predominância de *C. albicans* e *C. parapsilosis* encontrando em cinco ocasiões culturas mistas com diferentes associações. Maffei²⁵ observou uma frequência menor (28,7%), no isolamento de leveduras em amostras anais de gestantes encontrando também *C. albicans* e *C. parapsilosis* como espécies predominantes. Candido et al.⁸ encontraram valores ainda menores (24%) em amostras anais e observaram uma cultura mista apresentando associação entre *C. albicans* e *R. rubra*. A maior frequência, no isolamento de leveduras, observada no presente trabalho em relação aos trabalhos citados, pode também ser justificada pelo uso de mais de um meio de cultura no primeiro isolamento.

Apesar de fezes e mucosas anais representarem o conteúdo intestinal, é esperado que a frequência de leveduras nessa última seja menor, principalmente devido a quantidade de material representada pelas diferentes amostras.

Concluindo, os dados do presente estudo refletem a grande diversificação de leveduras na microbiota humana da boca, vagina, ânus e fezes. Este conhecimento é importante visto que hoje em dia o maior risco de infecção ocorre através de microrganismos de nossa própria microbiota.

Muitas espécies, antes consideradas não patogênicas,

hoje são reconhecidas como causadoras de infecções, provocando muitas vezes quadros graves. Além disso, algumas delas, como por exemplo *C. krusei*, conferem resistência intrínseca a certos antifúngicos, comumente usados nos tratamentos, e outras como *C. dubliniensis*, podem adquirir

rapidamente resistência aos mesmos. Estes fatores aliados ao aumento da incidência de pessoas imunodeprimidas, têm levado à necessidade de um maior conhecimento da microbiota bem como de metodologias mais apropriadas para o isolamento e identificação de leveduras.

RIALA6/926

Silva, J. O., Franceschini, S. A.; Candido ; R. C. Presence of yeasts in the mucosae and feces of apparently healthy individuals and subjects with symptoms of fungal infection **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):113-120, 2002

ABSTRACT. The yeasts are widely distributed in our environment, being also normal inhabitants of our bodies. Yeasts are considered to be opportunistic pathogens causing infectious processes ranging from superficial to deep and fatal ones. The knowledge of the normal microbiota can help physicians to obtain a perspective about the possible source and importance of microorganisms isolated from infections. The objective of the present study was to determine the presence of yeasts in samples of the oral, vaginal, and anal mucosae and in fecal samples from apparently healthy individuals or individuals who presented symptoms of fungal infection. The media used for isolation were Sabouraud chloramphenicol agar, Biggy agar, CHROM agar Candida and Pagano Levin agar. Yeasts were isolated from 40.7% (35/86) of the oral samples, 26.2% (11/42) of the vaginal samples from asymptomatic individuals, 44.8% (13/29) of the vaginal samples from women with vaginal discomfort, from 34.6% (9/26) of the anal samples, and 77.5% (31/40) of the fecal samples. *C. albicans* was the predominant species in all sample types. Feces presented species diversity represented by the genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, and *Hansenula* nowadays *Pichia*.

KEY WORDS. *Candida albicans*, feces, microbiota, mucosae, yeasts.

REFERÊNCIAS

1. Arendorf, T.M.; Walker, D. M. *C. albicans*: its association with dentures, plaque and the oral mucosa. **J. Dent. Assoc. South Africa**, 35: 563-9, 1980.
2. Beck-Sagué, C. M.; Jarvis, W. R. and the national nosocomial infections surveillance system. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **J. Infect. Dis.**, 167: 1247-51, 1993.
3. Berdicevsky, I. et al. Oral Candida in asymptomatic denture wearers. **Int. J. Oral. Surg.**, 9: 113-5, 1980.
4. Birman, E. G. et al. *Candida albicans*: frequency and characterization in oral cancer (Stage I) from smokers and drinkers. **Rev. Iberoam. Micol.**, 14: 101-3, 1997.
5. Branchini, M. L. et al. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 452-6, 1994.
6. Carlson, P.; Richardson, M.; Paavonen, J. Evaluation of the oricult-N dipslide for laboratory diagnosis of vaginal candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, 38 (3): 1063-5, 2000.
7. Candido, R. C.; Azevedo, R. V. P.; Ito, I. Y. Leveduras: prevalência na cavidade bucal de portadores e não portadores de prótese total. **Rev. Odontol. UNICID**, 7: 27-33, 1995.
8. Candido, R. C.; Toloi, M. R. T.; Franceschini, S. A. Leveduras da vagina e do ânus de pacientes com e sem sintomas de candidíase vulvovaginal. **J. Bras. Patol.**, 34 (3): 154-9, 1998.
9. Candido, R. C.; Azevedo, R. V. P.; Komesu, M. C. Leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal com e sem lesão: detecção de suscetibilidade a antifúngicos – técnica do ETEST. **J. Bras. Patol.**, 35 (4): 210-6, 1999.
10. Coker, R. J.; Fisher, M.; Tomlinson, D. R. Management of mycoses associated with HIV disease. **Int. J. STD & AIDS.**, 6: 408-12, 1995.
11. Coleman, D. C.; et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives / new approaches. **Crit. Rev. Microbiol.**, 19: 61-82, 1993.
12. Colombo, A. L. et al. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in a AIDS patients. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, 38 (3): 197-200, 1996.
13. Enveani, I. B.; Obi, C. L.; Jokpeyibo, M. Prevalence of *Candida* species in Nigerian children with diarrhoeae. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 12: 133-5, 1994.
14. Fidel Jr., P. L.; Vasquez, J. A.; Sobel, J. D. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.** 12 (1): 80-96, 1999.
15. Fraser, V. J. et al. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. **Clin. Infect. Dis.**, 15: 415-21, 1992.
16. Geiger, A. M.; Foxman, B.; Sobel, J. D. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata* and no *Candida*. **Genitourin. Med.**, 71: 304-7, 1995.
17. Hopwood, V.; Evans, E. G. V.; Carney, J. A. Rapid diagnosis of vaginal candidosis by latex particle agglutination. **J. Clin. Pathol.**, 38: 455-8, 1985.

18. Hopwood, V. et al. Vaginal candidosis: relation between yeast counts and symptoms and clinical signs in non-pregnant women. **Geniturin. Med.**, 64: 331-4, 1988.
19. Hurley, R. et al. Incidence and distribution of yeasts species and of *Trichomonas vaginalis* in the vagina of pregnant women. **J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.**, 80: 252-7, 1973.
20. Jorge, A. O. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo.**, 11 (4): 279-85, 1997.
21. Kurtzman, P. C.; Fell, J. W. **The yeasts: a taxonomic study.** Amsterdam: Elsevier; 1998. 1055 p.
22. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C. **Micologia Médica.** 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 175-6, 187-90, 546, 561, 557, 586.
23. Lopes, J. et al. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trealose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. **J. Clin. Microbiol.**, 39 (3): 1172-4, 2001.
24. Lynch, D. P. Oral candidiasis : history, classification and clinical presentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, 78(2): 189-93, 1994.
25. Maffei, C. M. L. **Amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade à antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica.** São Paulo, 1996. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
26. Mendes-Giannini, M. J. S.; Melhem, M. S. C. Infecções fúngicas. In: Ferreira, A. W.; Ávila, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.226, 246-50.
27. Moura, M. E. G. M. **Frequência e distribuição de leveduras em amostras de conteúdo vaginal.** São Paulo, 1984. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
28. Odds, F. C. et al. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 26: 277-83, 1988.
29. Park, A. W. & Yaacob, H. B. Pathogenic microbes of the oral environment. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, 36 (1): 1-33, 1994.
30. Pedrazzi, A. H. P.; Ito, I. Y.; Verri, R. A. Leveduras Incidência e espécies prevalentes em materiais da orofaringe. **Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto.**, 11: 75-82, 1974.
31. Pfaller, A. et al. *Candida zeylanoides*: another opportunistic yeast. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1689, 1991.
32. Pfaller, M. A. Epidemiology of fungal Infections: current perspectives and future direction. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 1525, 1995.
33. Reagan, D. R. et al. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 2733-8, 1990.
34. Reef, S. E.; Mayer, K. H. Opportunistic Candidal Infections in patients infected with human immunodeficiency virus: Prevention issues and priorities. **Clin. Infect. Dis.**, 21, Suppl. 1: 99-109, 1995.
35. Samaranyake, L. P.; Holmstrup, P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. **J. Oral Pathol. Med.**, 18: 554-64, 1989.
36. Sobel, J. D. Controversial aspects in the management of vulvovaginal candidiasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 31: (S.10-3), 1994.
37. Sobel, J. D. et al. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clin Infect. Dis.**, 16: 93-9, 1993.
38. Sobel, J. D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiological, diagnostic and therapeutic considerations. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 178: 203-11, 1998.
39. Sobel, J. D. et al. Treatment of complicated *Candida* vaginitis: Comparison of single and sequential doses of fluconazole. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 185: 363-69, 2001.
40. Sota, M.; Ezpeleta, C.; Cisterna, R.; participantes en el estudio multicéntrico sepsis data del grupo para el estudio de la infección nosocomial de la SEIMC. Descripción de 165 episodios de fungemia de um estudio multicéntrico. **Rev. Iberoam. Micol.**, 16: 30-5, 1999.
41. Strausbaugh, et al. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. **J. Clin. Microbiol.**, 32 (9): 2299-300, 1994.
42. Tallero, et al. Estudio comparativo de la flora leveduriforme fecal y orofaríngea. **Rev. Iber. Micol.**, 15: 209, 1998. Resumen.
43. Talwar, P., et al. Fungal diarrhoea: association of different fungi and seasonal variation Journal of clinical Microbiology in their incidence. **Mycopathologia.**, 110: 101-5, 1990.
44. Warren, N. G.; Hazen, K. C. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology.** 7. ed. Washington: ASM Press, 1999, p. 1184-99.
45. Wingard, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 115-25, 1995.
46. Wray, D. et al. Alteration of humoral responses to candida in HIV infection. **Br. Dent. J.**, 168: 326-9, 1990.

Recebido em 27/08/2002; Aprovado em 05/12/2002

Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas

Quality Evaluation of Frozen Fruit Pulp

Silvia M. BUENO¹
Maria do Rosário V. LOPES¹
Rejane A. S. GRACIANO¹
Eliana C. B. FERNANDES¹
Crispin H. GARCIA-CRUZ^{2*}

RIALA6/927

Bueno, S. M. et al.. Avaliação da qualidade de Polpas de Frutas Congeladas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2):121-126, 2002

RESUMO. Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e microscópicas de 15 amostras diferentes de polpa de fruta congelada de uma única marca comercial, com o objetivo de verificar a qualidade destas polpas, uma vez que, são consumidas *in natura*. Os resultados obtidos indicaram que, do ponto de vista microbiológico, todas as amostras analisadas atendiam à legislação em vigor. Entretanto, as análises físico-químicas mostraram que, das 13 amostras que apresentam limites estabelecidos pela legislação vigente, 4 (31%) se enquadravam como produto em desacordo com a mesma legislação. As polpas de abacaxi e morango não apresentam padrões legais de identidade e qualidade. As análises microscópicas mostraram que 60% das amostras apresentaram fragmentos e/ou larvas de insetos e ácaros. Foram também detectados fragmentos micelianos. Os resultados indicaram que 53% das amostras foram enquadradas como produtos inaceitáveis para o consumo, quanto às características microscópicas. Portanto, existe a necessidade de estabelecer métodos que sirvam como padrão para o controle microscópico destes produtos, além da exigência de contagem de filamentos micelianos em polpas de frutas congeladas.

PALAVRAS CHAVE: Polpas de frutas congeladas, microbiologia, microscopia, análises físico-químicas.

INTRODUÇÃO

As frutas por serem perecíveis, deteriorarem em poucos dias, têm sua comercialização “*in natura*” dificultada a grandes distâncias. Além disso, estima-se que perdas pós-colheita variem de 15 a 50%. A produção de polpas de frutas congeladas se tornou um meio favorável para o aproveitamento integral das frutas na época da safra evitando os problemas ligados à sazonalidade⁴.

A legislação brasileira do Ministério da Agricultura define polpa de fruta como o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtida pelo esmagamento de frutos polposos, através de um processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais proveniente da parte comestível do fruto, específico para cada um destes mesmos⁵.

As polpas devem ser preparadas com frutas sãs, limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitas e detritos de animais ou vegetais. Não deverão conter fragmentos das partes não

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório de São José do Rio Preto, SP.

* Endereço para correspondência: ² Universidade Estadual Paulista – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – Campus São José do Rio Preto, SP.

comestíveis da fruta, nem substâncias estranhas à sua composição normal. Deve-se também observar as características microscópicas, como ausência de sujidades, parasitas e larvas⁹.

No rótulo da embalagem do produto deverá constar a denominação “polpa”, seguido do nome da fruta de origem. As características físicas, químicas e organolépticas deverão corresponder às provenientes do fruto de sua origem, observando-se os limites mínimos e máximos fixados para cada polpa de fruta, previstos nas normas específicas⁵.

A polpa de fruta têm grande importância como matéria prima em indústrias de conservas de frutas, que podem produzir as polpas nas épocas de safra, armazená-las e reprocessá-las nos períodos mais propícios, ou segundo a demanda do mercado consumidor, como doces em massa, geléias e néctares⁷. Ao mesmo tempo também são comercializadas para outras indústrias que utilizam a polpa de fruta como parte da formulação de iogurtes, doces, biscoitos, bolos, sorvetes, refrescos e alimentos infantis.

Atualmente com a tecnologia disponível, o mercado de polpas de frutas congeladas tem tido um crescimento razoável e apresenta grande potencial mercadológico em função da variedade de frutas com sabores exóticos bastante agradáveis. Devido a inexistência de padrões para todos os tipos de frutas, encontram-se no mercado produtos sem uniformidade. Considerando tal fato, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento das características microbiológicas, microscópicas e físico-químicas de diferentes polpas de frutas congeladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram adquiridas de um supermercado de grande porte da cidade de São José do Rio Preto - SP, 15 polpas congeladas, em triplicatas, das frutas: cupuaçu, acerola, goiaba, cacau, manga, cajá, uva, caju, mamão, melão, abacaxi, siriguela, umbu, morango e açaí. Todas da mesma marca comercial, mesmo lote e dentro do prazo de validade. As amostras foram transportadas ao laboratório para análise sob refrigeração em caixa de isopor.

A) Análise microbiológica

Preparo das amostras

Cada amostra foi reconstituída segundo as indicações do rótulo na embalagem, ou seja cada saco de polpa de 100g foi diluído em 200 mL de água destilada estéril. Pipetou-se 10mL da amostra, que, a seguir, foi transferida para um erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril com posterior homogeneização (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição procedeu-se as demais diluições decimais seriadas até 10^{-3} .

Determinação do número mais provável de coliformes totais

Cada amostra foi inoculada em 3 séries de 3 tubos contendo 9 mL de caldo lauril sulfato triptose com 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Homogeneizou-se e incubou-se a 35°C durante 48 h. O cálculo do número mais provável (NMP) de coliformes totais foi realizado com o auxílio da tabela de Hoskins⁸.

Determinação do número mais provável de coliformes fecais

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, usando-se o caldo EC. Após a inoculação, os tubos foram incubados a $44,5^{\circ}\text{C}$, em banho maria, por 24 h. O cálculo do número mais provável (NMP) de coliformes fecais foi realizado com o auxílio da tabela de Hoskins⁸.

Pesquisa de *Salmonella* sp

Foram homogeneizados 25mL de cada polpa de fruta reconstituída em 225 mL de caldo lactosado adicionado de 0,5% de Na_2SO_3 . Após a incubação a 35°C por 24 h, 1mL dessa suspensão foi transferido para 10 mL de caldo selenito-cistina, e incubado a 35°C . Depois de 24 h, 48 h e 5 dias foram realizadas semeaduras por esgotamento em placas de Petri contendo ágar SS (*Salmonella-Shigella*) e ágar verde brilhante. As colônias suspeitas foram submetidas a testes sorológicos⁸.

B) Análise físico-química

Preparo das amostras

Cada uma das polpas de frutas foi preparada segundo instruções do rótulo, ou seja, 100g de polpa para 200 mL de água destilada, com exceção do açaí, e foram submetidas às análises físico-químicas descritas a seguir, determinadas para cada tipo de polpa de fruta de acordo com a legislação⁵. Os resultados foram expressos em relação à amostra original.

Sólidos solúveis em °Brix

A determinação de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada em refratômetro da marca PZO-Warszawa-Poland.

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro da marca Analion - pm 608.

Outras determinações

Os teores de umidade, cinzas, sólidos totais e proteínas foram determinados segundo metodologia descrita em AOAC (1995)³, respectivamente, métodos 934.06, 490.26, 920.151 e 960.52.

Os parâmetros acidez titulável, ácido ascórbico, gordura e açúcares redutores (em glicose) e não redutores (em sacarose) foram determinados como descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985)¹¹, segundo os métodos 4.7.1, 31.6.1, 4.10, 4.13.2 e 4.13.3, respectivamente.

Carboidratos totais

A determinação dos teores de carboidratos totais foi realizada por diferença:

$$\% \text{ carboidratos totais} = 100 - \% (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{lipídeos})$$

C) Análise microscópica

Foi realizada a determinação de fragmentos de insetos (para polpas com °Brix entre 8 e 20); larvas e ovos de insetos (para as polpas com °Brix entre 13 e 20); determinação de matérias estranhas por flutuação (polpas de frutas com °Brix entre 6 e 7,9)¹⁵. A contagem de micélios de fungos foi realizada pelo método de Howard como descrito em *Citrus Handbook*^{2,6}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Análise microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas realizadas para as polpas congeladas mostraram que estas se encontravam adequadas para o consumo, uma vez que estão de acordo com a legislação vigente, à qual estabelece ausência de *Salmonella* em 25g e um limite máximo para coliformes fecais de 1,0 NMP/g de amostra⁵.

B) Análise físico química

Os resultados das análises físico-químicas estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1 estão representadas as características físico-químicas encontradas no produto rotulado como polpa de açaí do tipo B (médio). A Instrução Normativa n° 1 de 07/01/00 apresenta diferenças entre as definições para os produtos “polpa de açaí” e “açaí tipo B (médio)” e estabelece limites diferentes para estes 2 tipos de produtos⁵. Na rotulagem do produto analisado, encontra-se uma divergência relacionada à descrição do produto, por parte do fabricante, ficando o mesmo numa situação intermediária entre as definições, dificultando o enquadramento legal do produto.

De acordo com os resultados encontrados o produto se enquadra melhor como açaí tipo B (médio), pois seu teor de sólidos totais foi de 11,04% e os limites legais estabelecidos estão na faixa de 11,0 a 14,0%⁵. Ainda nesta mesma Tabela 1 pode-se observar que o produto está em desacordo com a legislação vigente, por apresentar teor de proteína, abaixo dos limites mínimos estabelecidos (6,0 g/100gms).

Tabela 1. Resultados das características físico-químicas da polpa de açaí.

	Açaí	Polpa ^a	Açaí ^b
Proteínas (g/100 g ms*)	0,90	+	+
Lipídeos (g/100 g ms*)	43,47	+	+
Carboidratos totais (g/100 g ms*)	53,30	+	
Açúcares redutores em glicose (% p/p)	Não encontrado		+
Açúcares não redutores em sacarose (% p/p)	-		+
Acidez titulável em solução normal (% v/p)	2,86		
Acidez em ácido cítrico (% p/p)	0,17		+
PH	4,25		+
°Brix	6,0		
Sólidos totais (% p/p)	11,04	+	
Cinzas (% p/p)	0,26		
Umidade (% p/p)	88,96		

* gms = gramas de matéria seca

a = análises requeridos pela legislação para polpa

b = análises requeridos pela legislação para açaí

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos das análises físico-químicas das polpas das outras frutas congeladas. Nesta pode ser observado que cupuaçu, cacau, cajá e melão estão em desacordo com a legislação vigente⁵ pois, apresentaram teores de sólidos totais e sólidos solúveis (°Brix) menores que os limites mínimos estabelecidos, indicando que pode ter sido adicionada água a estas polpas. Porém a composição observada pode indicar que as frutas foram colhidas durante o período das chuvas, o que promoveria a diluição dos sólidos.

Não foram detectados açúcares não redutores (expressos em sacarose) em todas as amostras de polpa congelada.

A polpa de cupuaçu apresentou, também, um teor percentual de açúcar total menor que o estabelecido pela legislação, provavelmente devido à porcentagem maior de umidade (89,7%) da polpa. Das 15 polpas de frutas estudadas, apenas 13 são consideradas na legislação vigente⁵. Destas, 4 (31%) estão em desacordo com os parâmetros legais.

Em relação às polpas de abacaxi e morango, a legislação vigente não apresenta padrões físico-químicos de identidade e qualidade. Neste trabalho foram realizadas determinações físico-químicas com a intenção de que possam servir de referência para trabalhos futuros ou como base para o estabelecimento de padrões de identidade e qualidade.

Algumas das polpas de frutas têm sido estudadas e os resultados obtidos relatados por diversos autores^{1,12,13}. Para polpa de acerola, por exemplo, cujo pH determinado foi de 3,3,

encontra-se dentro da faixa relatada na literatura (3,0 a 3,5). Em relação aos sólidos totais o resultado encontrado foi superior ao encontrado por Oliveira et al., (1998)¹³. Em relação a acidez em ácido cítrico, os dados foram similares aos encontrados por Nogueira (1991) e superiores aos encontrados por Oliveira et al., (1998) e Alves et al., (1995). Esta variação pode ser explicada pelo grau de maturação do fruto, uma vez que, à medida que o fruto amadurece o teor de ácido cítrico diminui¹. O teor de vitamina C encontrado foi de 1374,2 mg/100g, apesar de ser um valor alto, encontra-se na faixa de 831,7 a 1607,0 mg/100g, que é descrita por estes mesmos autores^{1,13}.

A polpa de caju apresentou um valor de pH (3,4) inferior ao valor relatado por Oliveira et al., (1998) (pH = 4,2), porém o conteúdo de vitamina C é superior (270 mg/100g) ao relatado por este autor (143,0 mg/100g).

Análise microscópica

As polpas de frutas não podem apresentar sujidades, fragmentos de insetos, fungos, leveduras, detritos orgânicos de outras substâncias que indiquem a utilização de ingredientes ou condições de higiene insatisfatórias ou processamento tecnológico inadequado⁵.

Considerando que as frutas estão sujeitas a contaminação por pragas em todas as etapas do processo de industrialização, pode ocorrer a presença de matérias estranhas, como fragmentos, larvas e ovos de insetos e ácaros nesses produtos¹⁴.

A qualidade e a vida útil de um produto alimentício como os sucos industrializados estão intimamente relacionadas com as condições da matéria prima, transporte, processamento e embalagem¹⁰.

Nas análises das 15 amostras de polpas de frutas, as sujidades encontradas foram: fragmentos de insetos, larvas, ácaros e um inseto inteiro (Tabela 3). Nesta Tabela, foram estipulados intervalos de conteúdo de sujidades segundo o tipo e número presentes em cada produto. Esta mesma tabela, mostra que as polpas de morango, manga e acerola, além de estarem contaminadas com fragmentos de insetos, apresentaram uma ou mais das outras sujidades.

Analisando a Tabela 3 observa-se que a porcentagem de amostras com ausência de fragmentos de insetos foi de 40%, e que a maior contaminação nos produtos analisados foi por fragmentos de insetos (60%).

A maior frequência de contaminação ocorreu na faixa de 1 – 5 fragmentos de insetos incidindo em 53% das amostras contendo esse tipo de contaminante, e dessas 20% estavam impróprias para o consumo por conter ácaros, larvas e insetos.

A legislação vigente⁵ exige ausência de sujidades, porém diante dos resultados obtidos é necessário que se estabeleça um limite de tolerância para fragmentos de insetos, devendo-se manter a exigência de ausência de sujidades para larvas, ovos, insetos e nematóides.

Neste estudo também verificamos a presença de fungos nas polpas de frutas e empregamos o método de Howard para contagem de filamentos micelianos como meio para verificar a qualidade destes alimentos, como demonstrado na Tabela 4 .

Tabela 2: Resultados das determinações físico-químicas das polpas de frutas congeladas.

Polpa de:	Ácido. Ascórbico (mg/100g)	°Brix	Acidez titulável (% v/p)	Acidez em ácido Cítrico (% p/p)	Acidez em ácido tartárico (% p/p)	Umidade (%p/v)	Sólidos totais (% p/p)	Açúcares redutores em glicose (% p/p)	pH
Cupuaçu	25,8	8,2	29,4	1,9	-	89,7	10,3	4,7	3,3
Acerola	1374,2	9,0	21,0	1,4	-	90,9	9,1	8,8	3,3
Goiaba	62,1	8,7	12,0	0,8	-	89,2	10,8	6,0	3,8
Cacau	-	13,2	14,1	0,9	-	85,1	14,9	10,7	3,6
Manga	-	13,5	15,6	1,0	-	85,1	14,9	6,0	3,3
Cajá	-	7,5	21,6	1,4	-	91,9	8,1	8,0	2,7
Uva	-	19,5	13,8	-	1,1	80,0	20,0	20,0	2,9
Caju	270,0	12,0	15,0	1,0	-	81,1	18,9	13,9	3,4
Mamão	-	10,0	3,6	0,3	-	89,5	10,5	10,1	4,3
Melão	-	6,0	6,9	0,5	-	93,5	6,5	4,2	4,5
Abacaxi*	-	11,7	12,0	0,8	-	88,2	11,8	9,2	3,5
Siriguela	11,7	16,5	13,0	1,2	-	81,4	18,6	10,0	3,0
Umbu	-	10,5	25,8	1,7	-	89,4	10,6	5,7	2,6
Morango*	12,8	6,75	14,7	0,9	-	92,5	7,5	5,5	3,4

* = sem padrão na legislação

** = não detectado

Tabela 3. Matérias estranhas leves em polpas de frutas.

Matérias estranhas leves		Polpa de Fruta
Tipo	Incidência	
Fragmentos de insetos	0	Mamão, caju, umbu, uva, açai, melão
morango	1 - 5	Cupuaçu, abacaxi, goiaba, siriguela, cacau, manga, cajá,
	5-10	Acerola
Larvas	1 - 2	Morango, manga
Insetos	1 - 2	Morango
Ácaros	1 - 2	Acerola

Tabela 4. Resultados de filamentos de fungos em polpas de frutas utilizando a contagem de Howard.

Campos positivos contendo filamentos de fungos (%)								
0 – 10	11 – 20	21 – 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 – 70	71 - 80	81 - 90
Caju		cupuaçu	umbu	cacau,		Acerola,	mamão	morango
Açai				cajá		manga		
Abacaxi								
Goiaba								
Uva								
Siriguela								
Melão								

Observamos que embora não tenha sido verificado o crescimento de microrganismos, foi constatada e verificada a presença de fungos não viáveis caracterizando o emprego de matéria prima não selecionada e deteriorada.

Devido ao fato de que para as polpas de frutas não há padrão na legislação quanto aos limites de tolerância, foi utilizado suco de laranja concentrado como referência e neste, é tolerada a contagem de até 10% de campos positivos com filamentos de fungos⁶. Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos das polpas e o limite permitido para o suco concentrado de laranja, foi considerado aceitável a polpa cuja porcentagem de campos positivos com filamentos micelianos for de até 10% e inaceitável todas aquelas cujos valores ficaram acima de 10%.

Os resultados obtidos mostraram que as polpas de frutas de cupuaçu, umbu, cacau, cajá, acerola, manga, mamão e morango ou seja, 53% das polpas analisadas, apresentaram porcentagem de campos positivos em filamentos micelianos acima de 10%, enquadrando-se como produtos inaceitáveis para o consumo, indicando que foi utilizada matéria prima deteriorada, enquanto

que as condições higiênicas das frutas utilizadas na produção das polpas de caju, abacaxi, goiaba, uva, siriguela, melão e açai, foram satisfatórias.

Sugerimos, que deveria ser incluída na legislação de polpas de frutas em vigor a exigência de contagem de filamentos.

CONCLUSÕES

As análises realizadas indicaram que, do ponto de vista microbiológico, todas as amostras atendiam à legislação em vigor. As análises físico-químicas indicaram que 4 (31%), das 13 amostras com limites estabelecidos, se encontraram em desacordo com a legislação. Nas análises microscópicas foi encontrado que 60% das amostras apresentaram fragmentos e/ou larvas de insetos e ácaros. Como foram encontrados fragmentos micelianos nas amostras de polpas de frutas congeladas, sugere-se que seja estabelecida a contagem destes filamentos nesses produtos, com base em metodologia padronizada.

Bueno, S. M. et al.. Quality Evaluation of Frozen Fruit Pulp. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(2):121-126, 2002

ABSTRACT. Microbiological, physical-chemical and microscopic analyses of 15 samples of frozen fruit pulp, from a single commercial brand, were carried out to verify pulp quality, because they are consumed in natura. The results have shown that, from the microbiological point of view, all samples were in compliance with the present legislation. However, the physical-chemical analyses showed that 4 (31%) of the samples were not in compliance with this legislation. The identity and quality of pineapple and strawberry pulp are not contemplated by the legislation. The microscopic analyses showed that 60% of the samples presented fragments and/or larvae of insects and acarids. Micelial fragments were also detected. The results indicated that 53% of the samples were unacceptable for consumption according to the legislation. Therefore, methods need to be established in order to serve as a model for the microscopic control of these products, in addition to the necessity of counting micelial filaments in frozen fruit pulp.

KEY WORDS. Frozen fruit pulp, microbiological, microscopic, physical-chemical analyses.

REFERÊNCIAS

1. Alves, R.E. Menezes, J. B.; Silva S. de M. **Colheita e pós-colheita de acerola**. IN: São José A. R. ; Alves R.E. Acerola no Brasil: Produção e mercado. Vitória da Conquista. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). 1995, p.77-89.
2. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 12 ed. Washington, 1975. v.1, cap. 40, p. 824.
3. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 16 ed. Washington, 1995. v.1, cap. 37, p.4-7.
4. Barret, R. L. del C.; Chitarra, M^o I. F.; Chitarra, A. B. Choque a frio e atmosfera modificada no aumento da vida pós-colheita de tomates: 2- Coloração e textura. **Ciê. Tecnol. Alimen.**, Campinas, v.1, n.14, p. 14-26, 1994.
5. Brasil, Leis, Decretos, etc. Instrução normativa N^o 1 de 7 de janeiro de 2000, **Diário Oficial da União N^o 6**, Brasília, 10 de janeiro de 2000. Seção I., p. 54-58. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta.
6. Citrus Handbook – **Technical Procedures**, March 1993 do U. S. Department of Agriculture (USDA).
7. Hoffmann, F. L. et al.. Microrganismos contaminantes de polpas de frutas. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, 17(1):32-37. Jan/abr. 1997.
8. International Commission on Microbial Specifications for Foods (ICMSF). **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. 2 ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978. v.1, 434p.
9. Jackix, M. H. **Doces, Geléias e frutas em calda**. L.M.C. Livraria. Campinas. Editora da UNICAMP. Ícone Editora LTDA. 1988.
10. Jackix, M. H. Doces. In: Van Dender, G.F. et al. – **Armazenamento de gêneros e produtos alimentícios**. São Paulo, Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, s.d.p. 1980. p. 67-103.
11. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas**, Ed. Imprensa Oficial do Estado S.A. IMESP. v.1, 1985. p.46-47 e 180-182.
12. Nogueira, C. M. C. da C. D. **Estudo químico e tecnológico da acerola (*Malpighia glabra L.*)**. Fortaleza, 1991, 119p. [Dissertação de mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará].
13. Oliveira, M. E. B. de et al. Qualidade de polpas congeladas de frutas, fabricadas e comercializadas nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. **Bol. CEPPA**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 13-22 jan/jun 1998.
14. Santos, M. C.; Zamboni, C. Q. Avaliação microscópica das condições higiênicas de extrato e purê de tomate e de catchup. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n.1/2, p.69-73, 1988.
15. Santos, M. C.; Rodrigues, R. M. M. S.; Zamboni, C. Q. Sucos de maracujá, tamarindo e uva: métodos de análise das condições higiênicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 50, n. 1/2, p. 239-243, 1990.

Recebido em 18/07/2001; Aprovado em 05/12/2002

Avaliação de dois sistemas para coleta de sangue de carneiro utilizado no preparo de meios de cultura

Evaluation of two systems for sheep blood collection used for preparing culture media

José Augusto de R. BARBOSA ^{1*}
Evelyn O. SARMENTO ¹
José Eduardo de R. BARBOSA ¹
José Carlos FARACO ¹
Renata S. FONTES ¹

RIALA6/928

Barbosa; J. A. de R. et al. Avaliação de dois sistemas para coleta de sangue de carneiro utilizado no preparo de meios de cultura. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):127-130, 2002.

RESUMO. Hemoderivados de origem animal são amplamente empregados no preparo de meios de cultura utilizados em práticas laboratoriais de interesse em Saúde Pública. Para avaliação da qualidade deste produto foram testados dois sistemas de coleta de sangue em carneiro. O sistema tradicional, utilizando seringa, e um sistema em bolsa confeccionada em cloreto de polivinila (PVC) atóxico. Foram utilizados 40 carneiros adultos, machos e fêmeas, distribuídos de forma aleatória em dois grupos compostos por vinte animais cada. O sangue coletado para o estudo foi manipulado com assepsia em ambiente estéril, sendo posteriormente incubado a 37 °C durante 24 horas e semeado em placas com ágar Mueller Hinton sangue (MHS) e em tubos com caldo de infusão cérebro coração (BHI). Os dados obtidos demonstraram a conveniência do uso da bolsa em PVC, por não apresentar crescimento bacteriano em nenhuma das amostras testadas.

PALAVRAS-CHAVE. Bolsa de PVC; sangue desfibrinado; coleta de sangue de carneiro; contaminação; hemoderivados.

INTRODUÇÃO

Hemoderivados de origem animal são amplamente empregados no preparo de meios de cultura utilizados em práticas laboratoriais. Os meios são formulados com o intuito de permitir o desenvolvimento de bactérias de interesse biomédico, possibilitando sua identificação e o estudo de suas propriedades biológicas, entre elas a capacidade de produzir hemólise ^{1,3}. O enriquecimento de meios de cultura como ágar sangue e ágar

chocolate é freqüentemente obtido através da adição de sangue desfibrinado de carneiro⁵. A qualidade do sangue empregado para enriquecimento de meios de cultura é importante, sendo dependente de vários fatores entre os quais a saúde do animal, a presença de substâncias que podem causar interferência no crescimento de microorganismos, e os métodos utilizados para processamento do sangue durante a elaboração do produto⁶. Com o objetivo de avaliar a qualidade do sangue em relação à esterilidade, foram testados dois sistemas para a coleta de

¹ Instituto Adolfo Lutz - Serviço de Biotério

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo 355, 01246 - 902, Cerqueira César - São Paulo - SP, e- mail: jaraeffray@hotmail.com

sangue em carneiros. O sistema tradicional, em que a coleta é realizada através de seringa, e o sistema que utiliza bolsa confeccionada em cloreto de polivinila (PVC) atóxico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 40 carneiros adultos saudáveis, sem raça definida, machos e fêmeas, submetidos a controle zootécnico e sanitário, distribuídos de forma aleatória em dois grupos compostos por 20 animais cada.

Os animais foram mantidos em instalação rural, em sistema semiconfinado recebendo ração balanceada, suplementação de sal mineral e água ad libitum.

Todos os procedimentos que envolveram os animais foram realizados de acordo com os princípios éticos que orientam a experimentação animal, com o intuito de evitar a dor e o sofrimento^{2,7}.

2. Materiais e Equipamentos

Foram utilizados dois sistemas para coleta de sangue:

Grupo A - sistema aberto, utilizando seringa hipodérmica de vidro estéril com capacidade para 50 mL, provida de agulha 40x12 (figura 1). Frascos de vidro estéreis com capacidade para 500 mL, contendo 80 gramas de pérolas de vidro e uso de Bico de Bunsen para transferência do sangue.

Grupo B - sistema fechado, utilizando bolsa confeccionada em PVC atóxico, medindo 145 mm x 250 mm, com capacidade total de 1000 mL e capacidade útil de 400 mL de sangue desfibrinado, contendo 80 gramas de pérolas de vidro, conectada a um tubo de silicone de 1 m de comprimento, provido de agulha 40x16, em aço eletropolido (figura 2). Este sistema foi esterilizado através de radiação gama e produzido por J.R.Comércio de Produtos Hospitalares Ltda. (Campinas-SP).

3. Procedimentos para sangria e controle de esterilidade

Os animais foram contidos em decúbito lateral para coleta do sangue. Foi realizada tricotomia na região da veia jugular externa e anti-sepsia com solução de álcool iodado previamente a venopunção⁴. O garrote foi aplicado na região do pescoço.

No grupo A, a venopunção foi feita com agulha 40x12 conectada a seringa para coleta do sangue. Após atingir o volume de 50 mL, a seringa foi desconectada e imediatamente outra seringa foi conectada a agulha inserida na veia do animal, retirando-se desta forma, alíquotas de 50 mL de sangue por vez.

A transferência do sangue da seringa para o frasco estéril contendo pérolas de vidros, foi feita dentro da área de segurança proporcionada pelo bico de Bunsen (figura 3). Após a transferência, o frasco foi vedado com tampão estéril e agitado manualmente durante aproximadamente 15 minutos para o processo de desfibrinização do sangue.

No grupo B, após a venopunção com agulha 40x16 conectada de forma permanente ao sistema, o sangue foi

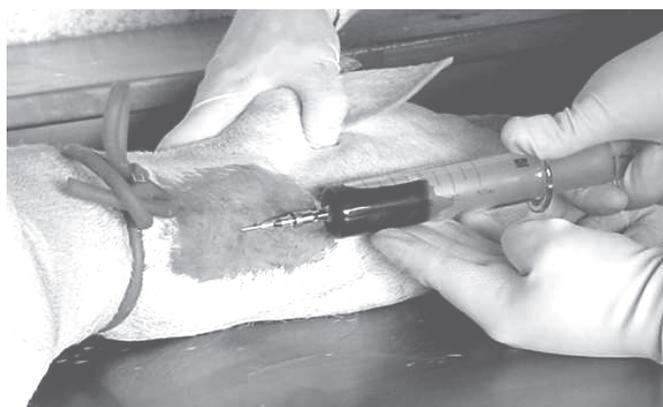


Figura 1. Grupo A - Sistema aberto de coleta de sangue com seringa.



Figura 2. Grupo B - Sistema fechado de coleta de sangue com bolsa em PVC.

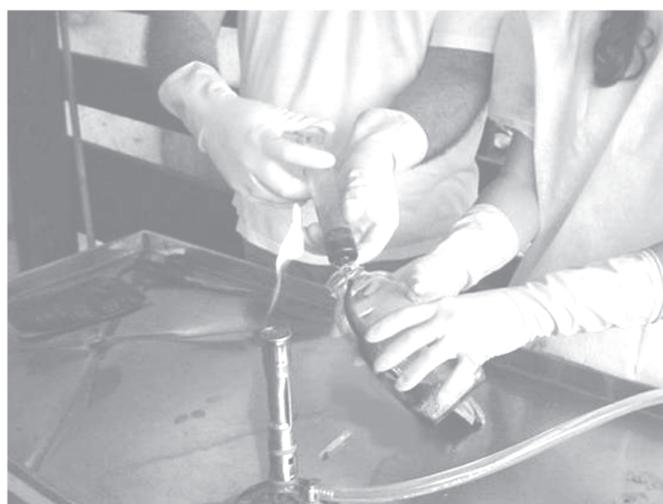


Figura 3. Grupo A - Transferência do sangue através de seringa para frasco estéril.

coletado diretamente para a bolsa em PVC, disposta em posição inferior ao animal, até que o volume necessário seja alcançado.

A vedação do sistema foi realizada manualmente através de um nó, feito no tubo de ligação entre a agulha e a bolsa, que foi agitada manualmente por 15 minutos para desfibrinização do sangue. Os frascos e bolsas com sangue foram identificados e transportados para o laboratório para monitoramento.

O sangue proveniente dos grupos A e B foi manipulado em ambiente estéril, sendo posteriormente incubado em estufa a 37 °C durante 24 horas para ser semeado com assepsia em placas com ágar Mueller-Hinton, enriquecidas com 5% de sangue de carneiro (MHS) e tubos contendo 3 mL de caldo de infusão cérebro e coração (Brain Heart Infusion Broth - BHI).

Para verificação de esterilidade, as placas MHS e os tubos BHI foram incubados a 37 °C por 24 e 48 horas respectivamente. A partir do crescimento bacteriano observado, foram feitos esfregaços em lâmina para serem posteriormente corados pelo método de Gram.

4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Fisher para determinação de eventuais diferenças significantes entre os grupos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos após os respectivos períodos de incubação, demonstraram que o sistema que utiliza bolsa em PVC não apresentou contaminação detectável pela metodologia empregada. O sistema aberto, que utiliza seringa, revelou a

presença de contaminação em 35 e 40 % das amostras testadas, conforme os resultados apresentados nas tabelas I e II, respectivamente.

A partir das colônias bacterianas obtidas das placas e tubos que apresentaram contaminação, foram feitos esfregaços em lâminas, que corados pelo método de Gram indicaram a presença de cocos Gram positivos. Neste estudo, não foi realizada a identificação dos microrganismos.

Para análise estatística foi utilizado o teste de Fisher, que afasta a hipótese de casualidade, uma vez que o resultado observado ($p < 0,01$) comprovou existir diferença significativa entre os métodos utilizados.

CONCLUSÕES

A obtenção de sangue de carneiro para elaboração de produtos biológicos apresenta dificuldades operacionais, pois além de ser um material extremamente vulnerável a contaminação por microrganismos, é coletado em condições de campo, geralmente distante de instalações adequadas.

Com o objetivo de obter um produto de qualidade, indispensável às práticas laboratoriais voltadas ao diagnóstico e pesquisa, foi desenvolvida uma bolsa em PVC atóxico, que por se constituir em um sistema fechado e estéril, proporciona condições ideais para a execução de sangria em animais, praticamente independente das condições ambientais.

Neste trabalho demonstrou-se que no sistema aberto, usado tradicionalmente, além da possibilidade de incidência de contaminação freqüente, ocorrem prejuízos financeiros e de atendimento ao cronograma das atividades decorrentes, chegando a determinar a contaminação de 40% das amostras

Tabela I. Distribuição do número e percentual de amostras semeadas em MHS segundo a presença de contaminação.

AMOSTRAS	Nº	GRUPOS			
		A		B	
		%	Nº	%	
Contaminadas	7	35	-	-	
Não contaminadas	13	65	20	100	
Total	20	100	20	100	

$p=0,00416$

Tabela II. Distribuição do número e percentual de amostras semeadas em BHI segundo a presença de contaminação.

AMOSTRAS	Nº	GRUPOS			
		A		B	
		%	Nº	%	
Contaminadas	8	40	-	-	
Não contaminadas	12	60	20	100	
Total	20	100	20	100	

$p=0,00163$

coletadas. No sistema fechado, que utiliza bolsa em PVC, não foi detectada contaminação, bastando a simples tricotomia e desinfecção da região onde foi efetuada a venopunção.

O aumento na qualidade do sangue obtido, aliado à

redução de custos, bem como à praticidade operacional, indica a vantagem da utilização do sistema fechado proporcionado pela bolsa de PVC na produção de insumos destinados a testes diagnósticos e pesquisas de interesse em Saúde Pública.

RIALA6/928

Barbosa; J. A. de R. et al. Evaluation of two systems for sheep blood collection used for preparing culture media. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):127-130, 2002.

ABSTRACT. Animal-origin hemoderived products are largely employed for culture media that account for laboratory practice of interest for Public Health. In order to evaluate the quality of this product, two systems of blood collection were tested, the traditional system that makes use of syringe, and a bag system made of atoxic polyvinyl chloride (PVC). Forty adult sheep, males and females, distributed at random in two groups of twenty animals each, were used. Blood used in this study was collected with asepsis, in a sterile environment, incubated at 37 °C for 24 hours, and then streaked out on Mueller Hinton blood agar plates and seeded in tubes with Brain Heart Infusion Broth (BHI). Our data showed that the PVC bags did not present any bacterial growth in the tested samples, indicating to be better than the traditional system.

KEY WORDS. PVC blood bag; defibrinated blood; sheep blood collection; contamination; hemoderivatives.

REFERÊNCIAS

1. Antunes G.S. Meios de Cultura. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS; 1998. p. 242-266.
2. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. [<http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm>] 03 março 2000.
3. Forney, J.E. Quality control of culture media. In: Lennette, E.H., editor. **Manual of Clinical Microbiology**. 4th ed. Washington: ASM Press; 1985. p.1037 – 1050.
4. Morton, D.B et al. Removal of blood from laboratory mammals and birds. **Lab. Anim.**, 27:1-22, 1993.
5. Moura, R.A. Meios de cultura. In: Moura, R.A., coord. **Técnicas de Laboratório**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p.169-179.
6. Nash, P.; Krenz, M.M. Culture media. In: Ballows, A., editor. **Manual of Clinical Microbiology**. 5th ed. Washington: ASM Press; 1991. p. 1226-1288.
7. Russell, W.M.S; Bush, R.L. **The Principles of Humane Experimentation Technique**. Special Edition. Potters Bar, UK: UFAW; 1992. 238 p.

Recebido em 02/09/2002; Aprovado em 05/12/2002

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

Christiane A. RISTORI^{1*}
Marco A. dos S. PEREIRA¹
Dilma S. GELLI¹

RIALA6/929

Ristori, C. A., Pereira, M. A. dos S., Gelli, D. S. O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubislaw. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 131-133, 2002

RESUMO. As especiarias e seus derivados têm sido usados no preparo de alimentos há milhares de anos, conferindo-lhes sabor e aroma diferenciados. A ação inibitória das especiarias e seus extratos nos diferentes microrganismos tem sido relatada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana da pimenta do reino preta moída (*Piper nigrum* L.) e de seu óleo essencial frente a uma cepa de *Salmonella* Rubislaw. Os efeitos da pimenta e seu óleo adicionados em meios de cultura foram avaliados em dois experimentos. No primeiro foram preparados dois tipos de meio de cultura sólidos, um com 1% de pimenta do reino e o outro com 1% de óleo essencial diluído em etanol, adicionados de caldo tripticase de soja (TSB) e ágar. As sementeiras foram feitas em superfície de diluições decimais (10^{-1} até 10^{-7}) da cepa de *S. Rubislaw*, em fase estacionária. Após a incubação a 35°C durante 24 a 48h, procedeu-se a contagem das colônias. No segundo experimento, 1mL da diluição 10^{-3} da mesma cepa, em fase estacionária, foi adicionada a 100mL de TSB com o óleo diluído em etanol, para uma concentração final de 100µg/mL. Após 24h de incubação a 35°C foram realizadas contagens padrão em placas. Os resultados obtidos nos experimentos não demonstraram efeito inibitório da pimenta do reino preta moída e de seu óleo essencial na cepa estudada.

PALAVRAS-CHAVES. pimenta do reino preta moída, *Salmonella* Rubislaw, atividade antibacteriana

¹ Instituto Adolfo Lutz Central – São Paulo, S.P. Seção de Microbiologia Alimentar

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP

As especiarias e seus derivados têm sido usados no preparo de alimentos há milhares de anos, conferindo-lhes sabor e aroma diferenciados. O Brasil é o segundo maior produtor de pimenta no mundo⁵, sendo que um dos componentes que contribuem para aumentar o seu valor como condimento é o seu óleo essencial. A ação inibitória das especiarias e seus extratos nos diferentes microrganismos tem sido relatada em diversos estudos^{1,2,4,8,9}.

O interesse renovado no uso de especiarias como agentes antibacterianos é atribuído basicamente a duas razões: (1) a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada havendo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas; (2) a redução do sal ou do açúcar em alimentos por razões dietéticas tende a aumentar o uso de outros temperos⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana da pimenta do reino preta moída (*Piper Nigrum* L.) e do seu óleo essencial frente a uma cepa de *Salmonella* Rubislaw.

Nesse estudo foi utilizada cepa de *S. Rubislaw*, obtida de pimenta, por ter sido este sorotipo o mais freqüentemente isolado em amostras deste produto, analisadas pela Seção de Microbiologia Alimentar, do Instituto Adolfo Lutz Central. A cultura da cepa, em fase estacionária, foi obtida em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 35°C por 18-24h (cerca de 10⁹ UFC/mL),

Foram realizados dois experimentos, baseados nos testes de Beuchat¹, um com meios de cultura sólidos e outro, em caldo. Beuchat testou a sensibilidade do *Vibrio parahaemolyticus* frente especiarias secas adicionadas em meios de cultura nas concentrações finais de 0.1-1.0% e seus óleos essenciais nas concentrações finais de 10 e 100 µg/mL. De acordo com os resultados apresentados no referido trabalho, foram escolhidas as concentrações mais altas de 1% e 100 µg.

No presente estudo, o primeiro experimento foi realizado preparando-se dois meios de cultura, um adicionado de 1% de pimenta do reino preta moída de três marcas diferentes (A, B e C) e o outro com 1% de óleo essencial de pimenta do reino preta diluído em etanol absoluto. O meio de cultura base foi: 3 g de caldo tripticaseína de soja (TSB) em pó e 1g de ágar para solidificação em 100mL de água destilada. O controle negativo dos meios foi realizado sem adição do óleo essencial ou pimenta, isto é, apenas o meio base sem adição. Após a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, o meio foi distribuído em placas de Petri (15-18mL/placa). Foram feitas diluições decimais até 10⁻⁷ da cultura de *S. Rubislaw*, em fase estacionária, em água peptonada tamponada a 1%. De cada diluição 0,1mL foi semeado em superfície de placas de Petri (7 placas) contendo o meio

sólido preparado anteriormente. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) contadas após 24 e 48h de incubação.

No segundo experimento, o óleo essencial foi diluído em etanol (0,1mL de óleo para 10mL de etanol) e uma alíquota de 0,1mL dessa solução foi adicionada em 100mL de TSB resultando em uma concentração final de 100µg de óleo por mL. Como controle, o etanol puro foi adicionado ao TSB. Alíquotas de 1mL da cultura de *S. Rubislaw* diluída até 10⁻³ foram inoculadas em TSB adicionado do óleo e no TSB controle. Após incubação do caldo a 35°C por 18/24h, foi retirada uma alíquota de 1mL para ser realizada a contagem padrão em placas, de acordo com SWANSON et al.¹¹.

Cada experimento foi repetido três vezes. Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os meios controles e os meios testes, mostrando assim que a pimenta do reino moída e o seu óleo essencial não foram eficientes para inibir o desenvolvimento de *S. Rubislaw*, quando em concentrações de 1% (experimento 1 – Tabela 1) e 100µg/mL (experimento 2 – Tabela 2).

A composição do óleo essencial de pimenta é complexa⁵. É importante ressaltar que os níveis dos compostos que possuem ação antibacteriana podem variar em função da espécie de pimenta, das condições de cultivo da mesma e da forma de extração, o que afeta diretamente a atividade inibitória do óleo essencial². Os componentes dos óleos essenciais exercem atividade antibacteriana por 1) interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular por aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; 2) alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais e 3) inativação ou destruição do material genético⁸.

Alguns fatores citados por diferentes autores podem explicar os resultados obtidos no presente trabalho: a quantidade de óleo essencial presente na pimenta pode variar²; o óleo essencial pode não se solubilizar de forma adequada⁷, a variação na composição do óleo em função das condições de cultivo¹⁰. Além disso, estudos têm demonstrado que, de maneira geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação do óleo essencial^{3,4,9}.

Observa-se que nesse estudo foi testada apenas uma cepa e sorotipo de *Salmonella* e que pode existir diferença no comportamento de outras cepas, assim como de sorotipos, no que se refere à sensibilidade frente a estes compostos naturais.

Tabela 1 – Contagem padrão (UFC/mL) e número (em Log10) de *S. Rubislaw* em meio de cultura adicionado de três tipos de pimenta do reino preta moída e de seu óleo essencial na concentração final de 1%.

CEPA	MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS				
	TSB controle	TSB + pimenta (Amostra A)	TSB + pimenta (Amostra B)	TSB + pimenta (Amostra C)	TSB + óleo essencial
<i>S. Rubislaw</i>	1,6x10 ⁹	8,8x10 ⁸	2,2x10 ⁸	3,9x10 ⁸	3,0x10 ⁹
UFC/mL					
(Log 10)	(9,20)	(8,94)	(8,34)	(8,59)	(9,48)

Tabela 2 - Contagem padrão (UFC/mL) e número (em Log₁₀) de *S. Rubislaw* em meio de cultura adicionado de óleo essencial de pimenta do reino moída preta em concentração de 100µg/mL.

CEPA	MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS	
	TSB controle	TSB + óleo essencial
<i>S. Rubislaw</i>	9,0x10 ⁸	1,1x10 ⁹
UFC/mL (Log 10)	(8,95)	(9,04)

RIALA6/929

Ristori, C. A., Pereira, M. A. dos S., Gelli, D. S. The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *salmonella* rubislaw. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2):131-133, 2002

ABSTRACT. Spices and their derivatives have been used in food housekeeping for thousands of years, bringing about differentiated flavor and aroma. Inhibitory action of the spices and their extracts on the different microorganisms has been reported. The objective of this work was to evaluate the antibacterial action of the ground black pepper (*Piper nigrum* L.) and of its essential oil on *Salmonella* Rubislaw strain culture. The effect of the pepper and its oil addition in culture medium was evaluated in two experiments. In the first one two types of solid culture medium had been prepared, one with 1% of ground black pepper and the other with 1% ethanol oil solution, added to broth tripticase soy (TSB) and agar. Sowings of dilutions (10⁻¹ up to 10⁻⁷) of the *Salmonella* strain, in stationary phase had been made in agar surface. After incubation at 35°C for 24/48h, standard count method was carried out. In a second experiment, 1mL of the same strain dilution 10⁻³, in stationary phase, was added to 100ml of TSB with the oil diluted in ethanol, to a final concentration of 100µg/mL. Standard count was carried out after 24h of incubation at 35°C. The results gotten in the experiments had not demonstrated inhibitory effect of the ground black pepper and its essential oil for the studied strain.

KEY WORDS: ground black pepper, *Salmonella* Rubislaw, antibacterial activity

REFERÊNCIAS

1. Beuchat, L.R. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. **J. Food Sci.** 41:899-902,1976.
2. Deans, S.G.; Ritchie, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol.** 5:165-180,1987.
3. Dorantes, L. et al. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. **Int. J. Food Microbiol.** 57:125-128,2000.
4. Farag, R.S. et al. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. **J. Food Protect.** 52 (9):665-667, 1989.
5. Ferreira, S.R.S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **J. Superc. Fluids** 14:235-245, 1999.
6. Ismaiel, A.; Pierson, M.D. Inhibition of Growth and Germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by Essential Oil of Spices. **J. Food Sci.** 55(6): 1676-1678,1990.
7. Juven, B.J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **J. Appl. Bacteriol.** 76:626-631,1994.
8. Kim, J.M. et al. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. **J. Food Sci.** 60(6):1364-1368,1995.
9. Ouattara, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **Int. J. Food Microbiol.** 37:155-162,1997.
10. Sivropoulou, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **J. Agric. Food Chem.** 44:1202-1205,1996.
11. Swanson, K.M.J. et al. "Colony count methods". In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F., ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Washington, D.C.; 1992, p.75-95.

Recebido em 27/02/2002; Aprovado em 05/12/2002

Avaliação de metodologias para a detecção de insetos, seus fragmentos e de resíduos de terra diatomacea em grãos e farinha de trigo

Atui, M.B. Avaliação de metodologias para a detecção de insetos, seus fragmentos e de resíduos de terra diatomacea em grãos e farinha de trigo. Curitiba; 2002. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia da Universidade Federal do Paraná].

Os métodos atuais para detecção de insetos e seus fragmentos em trigo e derivados são dispendiosos, demorados, necessitam de extensiva preparação da amostra, pessoal treinado e equipamentos caros. Recentemente, foi desenvolvido um método de imunoensaio, tipo ELISA, para ser aplicado a grãos inteiros e moídos, baseado na detecção da miosina do músculo do inseto. Este método pode representar um grande avanço na metodologia de análise, reduzindo tempo, custo e possibilitando o *screening* de um grande número de amostras de trigo em grão e de farinhas. Este procedimento permite determinar com antecedência o nível de infestação por insetos de cargas de trigo em grão antes do processamento, permitindo a rastreabilidade e certificação da qualidade das farinhas. O teste ELISA foi utilizado para detectar a presença e avaliar a degradação da miosina em grãos de trigo infestados com larvas de 4^o instar de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) em quatro tratamentos (1, 14, 28 e 56 dias) armazenados a 32°C e 65% de umidade relativa. O teste foi sensível para a detecção da miosina que se degradou rapidamente, durante as duas primeiras semanas depois que a larva foi morta, não mostrando diferenças significativas após este período. A porcentagem de degradação, após, aproximadamente, dois meses foi de 41,9%. O teste ELISA foi utilizado também para medir a degradação da miosina em amostras de farinha de trigo armazenadas por 32 dias em temperatura ambiente (24°C). A concentração da miosina no começo do estudo foi de 3,345 ng/poço e no fim de 2,382 ng/poço, mostrando uma redução de 28,8%. A miosina degradou-se rapidamente durante os primeiros oito dias de armazenamento, não mostrando diferenças significativas após este período. A detecção da miosina pelo teste ELISA foi comparada com o método da hidrólise ácida para contagem de fragmentos de insetos em amostras de farinha de trigo. Amostras de 1 Kg de trigo em grão foram infestadas com 0, 1, 2, 4, 8, 16 adultos de *R. dominica* e moídas para obtenção da farinha. O número de fragmentos de insetos detectado por ambos métodos foi proporcional ao nível de infestação. A contagem variou de 4,4 a

73,2 fragmentos de insetos nas amostras com 1 e 16 insetos, respectivamente. O limite mínimo de detecção do ELISA é de 0,5 insetos e o máximo é de 10 insetos por 50 g de amostra. As absorvâncias obtidas foram menores que a dos padrões para todos os níveis de infestação provavelmente pela degradação da miosina ou porque o kit não é tão sensível para *R. dominica*, uma vez que ele foi desenvolvido para *Sitophilus granarius*. Este representa uma ferramenta para triagem e verificação da infestação em trigo em grão e farinhas, possibilitando o monitoramento da qualidade sanitária, porém, não deve ser usado em amostras de farinhas armazenadas por mais de dois meses. Modificações são necessárias para aumentar a sensibilidade do kit a todas as pragas de produtos armazenados.

Como a utilização de terra diatomacea para o controle de insetos de grãos armazenados tem crescido consideravelmente, foi avaliado um método para a detecção deste pó inerte em grão de trigo e farinha. Dentro dos programas de certificação da qualidade, torna-se necessário, a existência de uma metodologia para a detecção destes pós inertes em grãos, pois a sua presença pode indicar que o produto tratado é de qualidade superior, ou seja não recebe aplicação de inseticidas líquidos. Amostras de trigo em grão foram tratadas com 250, 500, 750, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 g/t de pós inertes. De cada tratamento, tomou-se 50 g de trigo em grão e uma porção idêntica transformada em farinha, as quais foram analisadas para a detecção das carapaças. A recuperação das partículas só foi possível no trigo em grão, sendo a quantidade encontrada proporcional à usada no tratamento. Quanto às amostras de farinha, não foi possível recuperar partículas devido à massa formada quando se adiciona, álcool ou água, dificultando a separação. A utilização de água foi mais adequada que o álcool para separação do material, mesmo nas amostras tratadas com pequenas quantidades de pó inerte (250 g/t). As metodologias estudadas, tanto para a detecção de insetos e fragmentos, quanto para terra diatomacea, são instrumentos indispensáveis para a avaliação da qualidade sanitária de grãos armazenados e seus derivados.

Tese disponível na biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.

Hazards analysis and critical control point in whole wheat flour processing.

Nogueira, M. D. **Hazards analysis and critical control point in whole wheat flour processing.** São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP]

Food safety is a major concern facing the food industry today. Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) provides a structured approach to the assurance of safety of products. The aim of this study was to verify the use of HACCP system in a milling industry, precisely in the whole wheat flour production. At first step two hazards were analyzed: deoxynivalenol (DON) and allergenic mites in whole wheat flour. Thirty (30) lots of flour were collected in an industry which capacity was 15 ton./h in São Paulo city. Those lots had 30 sub-samples of argentine (A) wheat, 17 sub-samples of brazilian (B) wheat, 30 sub-samples of wheat for milling (M), and 30 sub-samples of whole wheat flour (FTI) that were analyzed in a five months period (from 97/ october to 98/march). Light filth was isolated from grains and flour, according to Official Methods of AOAC International. Methodology of extraction of light filth from whole wheat flour was studied to know the repeatability according to AOAC methods. Fungi isolation was performed according to AOAC/ FDA Bacteriological Analytical Manual (1992) methodology;

genera were identified according Gelli *et al.* (1990), Samson *et al* (1995), and Pitt and Hocking (1997). Detection and quantification of deoxynivalenol (DON) were done by thin layer chromatography (TLC) according to Sabino *et al.* (1989). The most significant light filth contamination in wheat were mites (A= 90%; B= 53%; M= 77% e FTI= 57%), argentine wheat had as a predominant mites the family Tarsonemidae and flour had Acaridae. The average fungal contamination in grains was 99%, 95% e 94% in argentine, brazilian and wheat for milling respectively. The predominant genera was *Aspergillus* spp (A= 79,0; B= 39,3% e M= 64,2 %), and *Fusarium* was the least frequent in wheat (A= 2,7%; B= 2,8% e M= 1,5%). Only one lot of whole wheat flour was contaminated by DON at level 231 ng/g. This study showed that HACCP system is appropriated for control hazards in milling industry. However, DON should be controlled before wheat get into industry, and this control must be registered. Mites are new emergentes to cause allergy by ingestion and have to be controlled by GMP procedures.

* Available in library of Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo and in the library of Instituto Adolfo Lutz.
e-mail: dimonog@usp.br ou dimonog@ial.sp.gov.br

ISSN 0073-9855



9 770073 985009