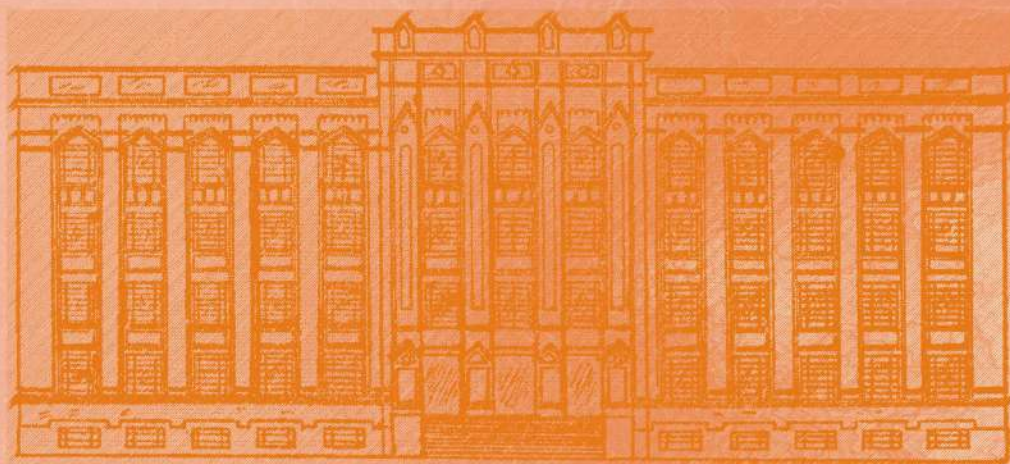


# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 59 número 1/2, 2000

NESTA EDIÇÃO  
BOLETIM DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
Ano 10 número 1-3, 2000



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

# **IV Encontro do Instituto Adolfo Lutz**

## **I Encontro Nacional dos Laboratórios de Saúde Pública**

**15 A 18 DE OUTUBRO DE 2001**  
**Centro de Convenções Rebouças – São Paulo**

**LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA: SISTEMA DE VIGILÂNCIA, ÉTICA E CIDADANIA**

TEMAS:

### **ÁREA MÉDICA**

- ✓ Doenças Transmitidas por alimentos
  - ✓ Câncer: papilomavirus, PSA
    - ✓ Diabetes
    - ✓ Hipertensão
    - ✓ Obesidade
    - ✓ Hepatite
  - ✓ Febre amarela
  - ✓ AIDS – HIV
- ✓ Fungos emergentes
- ✓ Organismos Geneticamente Modificados
  - ✓ Bioinformática
  - ✓ Biossegurança
    - ✓ Bioética
  - ✓ Qualidade

### **ÁREA QUÍMICA**

- ✓ Alimentos e alimentos transgênicos: legislação, embalagem, rotulagem, segurança alimentar (aditivos)
  - ✓ Água
- ✓ Medicamentos genéricos
  - ✓ Cosmetologia

---

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - CEP. 01246-902 - São Paulo - SP  
Fone (0xx11) 3068-000 - Fax. (0xx11) 3085-3505  
<http://www.ial.sp.gov.br> - E-Mail: [encontro@ial.sp.gov.br](mailto:encontro@ial.sp.gov.br)

---

**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: [bibioteca@ial.sp.gov.br](mailto:biblioteca@ial.sp.gov.br)  
[riala@ial.sp.gov.br](mailto:riala@ial.sp.gov.br)

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

---

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

1941 - 2000,  
2000, 59 (1/2)

Em apenso, a partir de 2000, 59(1/2): Boletim do Inst. Adolfo Lutz, ano 10 n° 1-3,  
2000

ISSN 0073-9855  
RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

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

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

Acesso on line/ on line access  
Texto integral/ full text  
[www.ial.sp.gov.br](http://www.ial.sp.gov.br)

## AOS COLABORADORES

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

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

### NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Serão aceitos manuscritos em forma de artigos científicos, de revisões, de atualizações, relatórios técnicos, relatos de casos, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores devem escrever na carta de encaminhamento qual a natureza do trabalho. Os originais serão publicados em língua portuguesa ou inglesa preferencialmente. Deverão ser encaminhados em três vias, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e em disquete 3 ½ 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: “Taunay<sup>31</sup> verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra e: “Pereira e Maia<sup>19</sup>, pesquisando...”. para mais de dois autores usar a expressão et al. : “no trabalho de Tsunoda et al.<sup>69</sup>”; ou ainda... “Segundo vários autores<sup>1,3,7,8</sup>”.

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

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

**Para artigos periódicos**

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

Exemplo:

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

**Livro no todo**

Último sobrenome do (s) autor (s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra, edição, imprensa (local de publicação, editora e ano de publicação), descrição física (nºs páginas ou volumes), notas especiais.

Exemplo:

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

**Capítulo de Livro**

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

Exemplo:

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

Gomes, S. Informática e soberania. In: Benakouche, R.(org.). **A questão da informática no Brasil**. São Paulo: Brasiliense; 1985. p.30-36.

**Dissertações e Teses**

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

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

Exemplo:

Trucksess, M.W.; Chou, J. P.; Young, K.; Page, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in barley, green coffee and roasted coffee. **FDA Science Forum Poster Abstract**, [http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/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

- 875 Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante  
*In vitro* cytotoxicity of hydrogel membranes reticulate by ionizing radiations  
Sizue O. ROGERO, Áurea de SOUZA-BAZZI, Tamiko I. IKEDA, Áurea S. CRUZ, Katia C. FERNANDES  
e Olga Z. HIGA ..... 1-5
- 876 Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato  
Sensorial differences between floral honey and honeydew honey  
Gisélia CAMPOS e Regina Célia DELLA MODESTA ..... 7-14
- 877 Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida  
em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*  
Evaluation of the use of microtitre plate technique to determine the minimal inhibitory concentration of isoniazid  
in *Mycobacterium tuberculosis* strains  
Maria Alice S. TELLES e Alessandra MOSCA ..... 15-19
- 878 Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência  
Occurrence of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography  
Guilherme PRADO, Marize S. de OLIVEIRA, Mariem R. da CUNHA, Maria de Fátima GOMIDES, Fabiana  
M. ABRANTES, Luciana G. dos SANTOS, Thaís VELOSO e Rita E. de S. BARROSO ..... 21-25
- 879 Avaliação da alimentação de pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba, Estado do Amazonas  
Feeding evaluation of pre-school children from Barcelos and Ajuricaba, Amazon State  
Lucia K. O. YUYAMA, Jaime P. L. AGUIAR, Sonja H. M. MACEDO, Fernando H. ALENCAR, Dionisia  
NAGAHAMA, Déborah I.T. FÁVARO, Cláudia AFONSO, Marina B. VASCONCELLOS e Silvia M. F.  
COZZOLINO ..... 27-32
- 880 *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 - 1999  
*Salmonella*: serotypes identified in the São José do Rio Preto area, SP, during the period of 1990 - 1999  
Ivete A. Z. C. de ALMEIDA, Jacqueline T. M. PERESI, Inara S. de CARVALHO, Elisabete C. A. RODRIGUES,  
Denise F. MARQUES, Ana T. TAVECHIO e Sueli A. FERNANDES ..... 33-37
- 881 Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado  
Physicochemical and sanitary-hygienic evaluation of fresh bottled and pasteurized orange juices  
Maria Helena IHA, Rosa Maria D. FÁVARO, Marina M. OKADA, Sônia de Paula T. PRADO, Alzira Maria  
M. BERGAMINI, Maria Aparecida de OLIVEIRA e Neusa S. GARRIDO ..... 39-44

882	Incidência de parasitos da família Anisakidae em bacalhau ( <i>Gadus morhua</i> ) comercializado no Estado de São Paulo Incidence of Anisakidae ( <i>Gadus morhua</i> ) parasites in the cod fish marketed in the State of São Paulo Amélia D. PEREIRA, Marcia B. ATUI, Domingas M. A. G. V. TORRES, Ana Célia S. MANGINI e Claydes Q. ZAMBONI .....	45-49
883	Surto de bacteriemia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil Outbreak of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteremia in a Hemodialysis Center in Campinas, São Paulo, Brazil Beatriz PISANI, Marise SIMÕES, Maria Angela G. PRANDI, Marilu M. M. ROCHA, Célia R. GONÇALVES, Tânia M. I. VAZ e Kinue IRINO .....	51-56

## RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Avaliação da resposta imune e da excreção viral em crianças vacinadas contra o sarampo Vaz de Lima, L.R.A. ....	57
Características de virulência e análise clonal de amostras de <i>Escherichia coli</i> dos sorogrupos O142, O127 e O86 Chilardi, A.C.R. ....	57
Vacinação de camundongos balb/c com o gene da gp43 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : estudo da resposta imune Pinto, A.R. ....	58
Comparação dos achados histopatológicos e de ploidia em neoplasia intraepitelial cervical: um tema de impacto em Saúde Pública Shirata, N.K. ....	59
Doença meningocócica: estudo epidemiológico comparativo em nível mundial, período 1887-1997 Requejo, H.I.Z. ....	59
Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no município de Eldorado, Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil, período de 1996-1997 Taniguchi, H.H. ....	60
Estudo comparativo de duas metodologias de xenodiagnóstico artificial, aplicadas simultaneamente em pacientes chagásicos crônicos, residentes na cidade de São Paulo, Brasil Almeida, T.T.C. ....	61
Estudo crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Martins, M.C. ....	61
Agradecimentos aos relatores .....	63
Boletim do Instituto Adolfo Lutz .....	65



# Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante

*In vitro* cytotoxicity of hydrogel membranes reticulate by ionizing radiations

Sizue O. ROGERO<sup>1</sup>  
Área de SOUZA-BAZZI<sup>1</sup>  
Tamiko I. IKEDA<sup>2</sup>  
Área S. CRUZ<sup>2\*</sup>  
Katia C. FERNANDES<sup>2</sup>  
Olga Z. HIGA<sup>1</sup>

RIALA6/875

Rogero, S.O. et al. Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 1-5, 2000.

**RESUMO.** Hidrogéis constituídos de poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP), ágar e polietilenoglicol (PEG) são utilizados como membranas para uso tópico, no tratamento de lesões de pele. Com o objetivo de melhorar algumas das propriedades mecânicas da membrana, como tensão de ruptura e alongação, substituiu-se o PEG pelo copolímero poli (dimetilsiloxano)-co-poli (óxido de etileno) (SEO). A biocompatibilidade “*in vitro*” das membranas de PVP-SEO com diferentes concentrações de SEO foi testada em cultura de células. O teste de citotoxicidade foi realizado pelo estudo comparativo de dois métodos: 1) difusão em ágar, utilizando-se as linhagens celulares RC-IAL e NCTC Clone L-929 e 2) inibição da formação de colônias utilizando-se a linhagem celular CHO-K<sub>1</sub>. Os resultados obtidos nos dois métodos foram análogos e demonstraram que as membranas do PVP-SEO apresentam toxicidade nas concentrações testadas e nas linhagens celulares utilizadas. Foi possível também concluir que a adição de SEO ocasiona caráter citotóxico às membranas de PVP.

**PALAVRAS-CHAVE.** Hidrogel; cultura de células; citotoxicidade; biocompatibilidade; polivinilpirrolidona.

## INTRODUÇÃO

Membranas de hidrogel constituídas por poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP), ágar e polietilenoglicol (PEG), reticuladas por radiação ionizante vêm sendo utilizadas como dispositivos médicos para uso tópico<sup>8,11</sup>. A principal vantagem desta

metodologia está na capacidade da radiação promover a reticulação em condições razoavelmente brandas, sem qualquer aditivo, além da esterilização simultânea<sup>4</sup>. Souza et al.<sup>13</sup> mostraram que a substituição do PEG nas membranas de hidrogel pelo copolímero poli (dimetilsiloxano)-co-poli (óxido de etileno) (SEO) aumenta o grau de reticulação tornando-as

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Supervisão de Radiobiologia

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz - Seção de Culturas Celulares

\* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP  
E-Mail: aurocruz@ial.sp.gov.br

mais resistentes à ruptura quando submetidas a uma força externa. O SEO foi selecionado por ser utilizado na indústria de cosméticos e na fabricação de lentes de contato<sup>12</sup>.

As membranas de hidrogel, como todos os biomateriais, devem ser submetidas a avaliação de biocompatibilidade que incluem ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”<sup>14</sup>.

Vários métodos “*in vitro*”, para avaliação da toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se a viabilidade celular por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias<sup>2,3,5,7,9</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade dos filmes de PVP, com diferentes concentrações de SEO, em sistemas celulares “*in vitro*”, bem como comparar a sensibilidade dos dois métodos utilizados: difusão em ágar e inibição da formação de colônias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Preparo das membranas

Os reagentes utilizados no preparo das membranas foram: PVP K-90 proveniente da GAF Corporation com massa molar  $3,6 \times 10^5$  g/mol, o copolímero SEO L7604 gentilmente cedido pela Osi Specialties, com massa molar  $4 \times 10^3$  g/mol e o ágar técnico n° 03 Oxóid L13.

Os 5 tipos de membranas foram preparados com PVP a 6%, ágar a 0,4% e SEO nas concentrações de 0; 0,5; 1,5; 3,5 e 4,5% (P/P), nas membranas numeradas de 1 a 5, respectivamente. As soluções aquosas de PVP, SEO e ágar foram preparadas separadamente, incorporadas a uma temperatura aproximada de 60°C e distribuídas em placas de Petri. Após a gelificação, as placas cobertas com filmes de PVC foram irradiadas com uma dose de 25kGy no acelerador de elétrons Dynamitron, com energia de 1,5MeV e taxa de dose de 22,4kGy/s. Ao término da irradiação, as amostras ficaram em repouso por 24h para atingir o equilíbrio.

### 2. Teste de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das membranas de hidrogel foi realizada utilizando-se dois métodos:

#### 2.1. Método de difusão em ágar

As linhagens celulares utilizadas foram: células de tecido conectivo de camundongo, NCTC Clone L-929 (CCL1-ATCC)<sup>1</sup> e células fibroblásticas de rim de coelho RC-IAL, isoladas no Instituto Adolfo Lutz<sup>6</sup>.

As células foram semeadas em placa de Petri (15x60mm), na concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/mL em Meio Mínimo de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibióticos, no volume de 5mL e incubadas durante 48h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de

cultura foi desprezado e adicionado 5mL do meio “overlay” em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (Difco) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro como corante vital. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o MEM duas vezes concentrado, ambos a uma temperatura de 44°C. As membranas a serem testadas foram cortadas em fragmentos de 5mm de diâmetro e colocadas sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h<sup>3,5,7,9,14</sup>.

Foram utilizados como controles positivos fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, respeitando a dimensão de 5mm de diâmetro. As amostras foram avaliadas em duplicata para cada linhagem celular.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a característica de citotoxicidade constatada por halo claro ao redor do material testado.

#### 2.2. Método inibição da formação de colônias<sup>2,9</sup>

Para a preparação dos extratos das amostras, utilizou-se a proporção de 1,4cm<sup>2</sup> de área superficial das membranas para cada mL do meio de cultura RPMI-SFB (RPMI 1640 com 10% de SFB e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) em frascos de vidro com tampa rosqueada incubados a 37°C/24h. Após este período foram feitas diluições seriadas de 50; 25; 12,5 e 6,25% dos extratos das membranas. Os controles negativo, extrato de polietileno de alta densidade (HDPE), e positivo, solução de fenol 0,02%, foram igualmente diluídos.

Utilizou-se a linhagem celular de ovário de hamster chinês CHO-K<sub>1</sub> (CCL-61-ATCC)<sup>1</sup> mantida em garrafas plásticas com o meio RPMI SFB. No momento do ensaio, volume de 2mL de uma suspensão celular contendo 100 células/mL, foi distribuído em placas de Petri de 15X60mm, as quais foram incubadas por 5h para permitir adesão celular, em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio de cultura foi removido e substituído por 5mL dos extratos puros e das diferentes diluições. As placas foram novamente colocadas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 7 dias. Para cada diluição do extrato utilizou-se placas em triplicata.

Após o período de incubação, os meios foram removidos e as colônias formadas fixadas em solução de formol 10% em solução salina 0,9% e coradas com Giemsa. As colônias visíveis foram contadas e comparadas com o número de colônias formadas na placa controle da linhagem celular CHO-K<sub>1</sub>, previamente incubada com o meio RPMI-SFB.

O potencial citotóxico foi avaliado e expresso pelo índice de citotoxicidade IC<sub>50(%)</sub>, correspondente à concentração do extrato que suprime em 50% a formação de colônias em relação ao controle.

## RESULTADOS

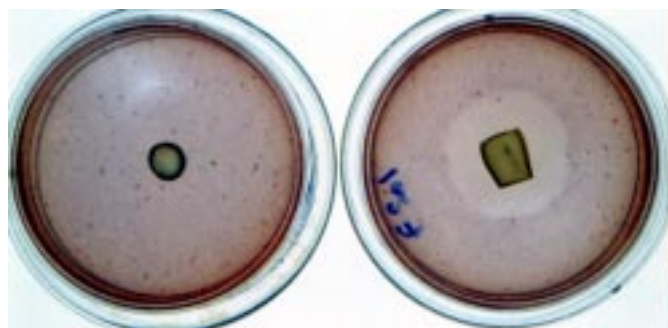
No teste de citotoxicidade, pelo método de difusão em ágar, a intensidade de morte celular foi avaliada pelo dimensionamento do halo claro formado ao redor da membrana em teste. O diâmetro do halo foi medido com uma régua milimétrica, e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Teste de citotoxicidade pela difusão em ágar das membranas de PVP-SEO

Amostras	Média dos diâmetros dos halos*	
	Linhagem celular NCTCL929	Linhagem celular RC-IAL
Contr. Negat.	0,0	0,0
Contr. Posit.	35,0	35,0
1	0,0	0,0
2	5,0	5,0
3	9,0	9,0
4	15,0	25,0
5	21,0	35,0

\* Valores expressos em mm

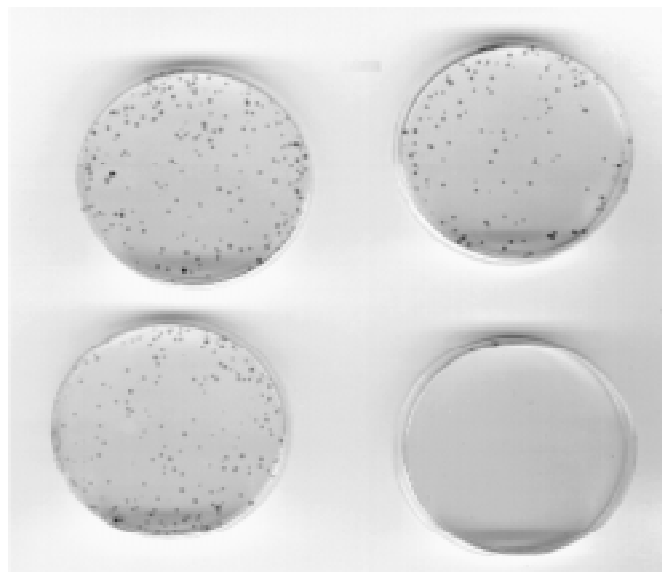
A presença do halo claro ao redor da membrana de PVP-SEO, contendo 1,5% de SEO, corresponde as células mortas (Figura 1).



**Figura 1.** Teste de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar: a- Controle negativo, b- Membrana de PVP-SEO com 1,5% de SEO

Na Figura 2 são apresentadas as placas de Petri do controle de células CHO-K<sub>1</sub>; do controle negativo; do controle positivo e da membrana de PVP contendo 0% de SEO, do ensaio de citotoxicidade pelo método de inibição de formação de colônias. A porcentagem da média do número de colônias em cada diluição foi calculada em relação à placa controle de células CHO-K<sub>1</sub> (Tabela 2).

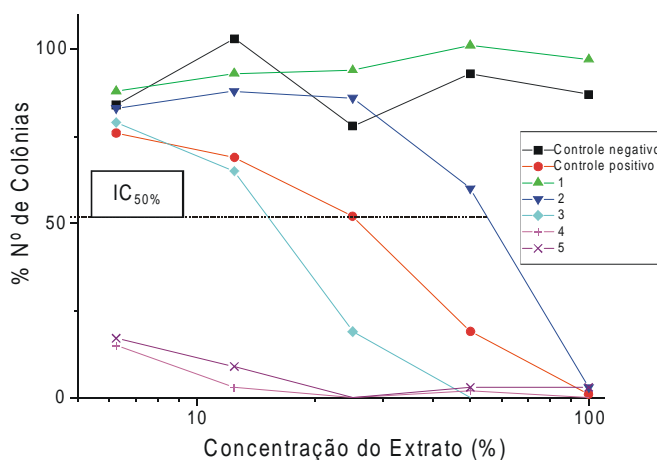
Lançando-se os dados da Tabela 2 num gráfico pode-se calcular quantitativamente o índice de citotoxicidade, que é representado pelo IC<sub>50(%)</sub>, como mostra a Figura 3.



**Figura 2.** Placas de Petri do teste de citotoxicidade pelo método de inibição de formação de colônias

**Tabela 2.** Percentual da média do número de colônias formadas, em diferentes concentrações dos extratos, em relação à placa controle, nas amostras de PVP-SEO e nos controles negativo e positivo

Amostras	% da Média do Número de Colônias				
	Concentração do Extrato				
	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
Contr. Negat.	84	103	78	93	87
Contr. Posit.	76	69	52	19	1
1	88	93	94	101	97
2	83	88	86	60	3
3	79	65	19	0	0
4	15	3	0	3	0
5	17	9	0	3	3



**Figura 3.** Curva de supressão de colônias. 1- 0% SEO; 2- 0,5% SEO; 3- 1,5% SEO; 4- 3,5% SEO e 5- 4,5% SEO

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os ensaios “*in vitro*” são habitualmente efetuados como testes de triagem no início da avaliação de biocompatibilidade de materiais. A ISO 10993-5 (1992) refere-se ao teste de citotoxicidade como um teste “*in vitro*” de aplicabilidade geral, usado largamente com o objetivo de sugerir, a partir de seus resultados, um plano de ensaios aplicáveis ao material. Uma das vantagens deste teste é sua alta sensibilidade, e os resultados obtidos tanto pela inibição de crescimento celular, formação de colônias, morte celular, e outros, indicam que este tipo de avaliação fornece informação integrada da ação dos componentes do material no meio biológico.

O copolímero SEO, constituído de cadeias de poli dimetil siloxana com cadeias enxertadas de poli óxido de etileno, foi adicionado às membranas de hidrogel de PVP por incrementar a resistência mecânica das mesmas. Ranby e Rabek (1977) verificaram que quando o poli óxido de etileno é submetido à radiação ionizante, há formação de radicais que podem ser decorrentes da cisão da cadeia.

Como a obtenção das membranas é feita via radiação ionizante, este fato pode levar à formação de algum componente tóxico, conforme verificado nos ensaios de citotoxicidade apresentados.

No teste de difusão em ágar (Tabela 1), a presença de halo foi observada em todas as membranas exceto naquela

identificada como 1, PVP com 0% de SEO, evidenciando liberação de componente tóxico pelas membranas de PVP com diferentes concentrações de SEO. A presença de halo nas placas indica morte celular, ou seja, citotoxicidade como se verifica no controle positivo, que apresentou um halo de 35mm.

Na Figura 3 observa-se que a membrana de PVP sem a presença de SEO apresenta  $IC_{50\%}$  superior a 100, portanto não citotóxica, assim como o controle negativo. A medida em que a concentração de SEO foi aumentada na formulação, houve aumento da citotoxicidade da membrana. O controle positivo apresentou  $IC_{50\%}$  de 28, isto é, a solução de fenol numa diluição de 28%, provoca a morte de 50% da população celular.

Os métodos de difusão em ágar e de inibição de formação de colônias podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade “*in vitro*”, das membranas de hidrogel, pois ambos demonstraram sensibilidade equivalente. Por estes testes concluiu-se que a adição de SEO na formulação torna as membranas de PVP citotóxicas e que o aumento da toxicidade é proporcional à concentração de SEO na formulação.

## AGRADECIMENTOS

- CNPq pela bolsa de estudos;
- Osi Specialties pelo fornecimento do SEO;
- Ao estudante Luciano Vieira da Costa pela assistência técnica no método de inibição da formação de colônias.

RIALA6/875

Rogero, S.O. et al. - *In vitro* cytotoxicity of hydrogel membranes reticulate by ionizing radiations. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2),1-5, 2000

**ABSTRACT.** Hydrogels composed by PVP, agar and PEG are used as wound dressings in the treatment of skin ulcers. In order to improve the mechanical properties of the membrane, such as tensile strength and elongation, PEG was replaced by copolymer poly (dimethylsiloxane)-co-polyoxyethylene (SEO). The “*in vitro*” biocompatibility evaluation of PVP-SEO membranes with different concentrations of SEO was carried out in cell culture. A comparative study of cytotoxicity assays was performed by two methods: 1) diffusion agar assay, using RC-IAL and NCTC Clone L-929 cells and 2) colony suppression assay, using CHO-K<sub>1</sub> cells. In the cytotoxic evaluation of PVP-SEO membranes by both methods, analogous results were obtained. It was also possible to conclude that the addition of SEO promotes cytotoxicity in PVP membranes.

**KEY WORDS.** Hydrogel, cell culture, cytotoxicity, biocompatibility, polyvinylpirrolidone.

## REFERÊNCIAS

1. American Type Culture Collection: **Catalogue of Cell Lines & Hybridomas**. 8<sup>th</sup> ed. Rockville, 1994.
2. Campus, V.E. et al. Cytotoxicity of vulcanized natural rubber latex films by the conventional process with sulphur and by the alternative process with ionizing radiation. **Proceedings of the 5<sup>th</sup> Latin American and 3<sup>rd</sup> Ibero American Polymer Symposium**, Mar del Plata, Argentina, p: 289-299 December 1996.
3. **Cell Culture Test Methods**. ASTM-STP 810 S.A. Brown ed. American Society for testing and materials, 1983.
4. Chapiro, A. Radiaton.chemistry in the field of biomaterials. **Radiat. Phys. Chem.**, 46(2): 159-160, 1995.
5. Cruz, A.S. et al. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 47 (1/2): 51-57, 1987.
6. Cruz, A.S. et al. Linhagem celular contínua de rim de coelho características e substrato para replicação de vírus. **Rev. Saúde Pública**, 26: 392-399, 1992.

7. Guess, W.L. et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, 54: 1545-1547, 1965.
8. Henglein, A. **J. Phys. Chem.**, 63: 1052, 1959 apud Encyclopedia of Polymer Science and Engineering 2<sup>nd</sup> ed. Polyvinylpirrolidone, 17: 199-257.
9. International standard: **Biological evaluation of medical devices** – Part 5: Tests for Cytotoxicity: “in vitro” methods. ISO 10 993-5, 1992.
10. Ranby, B.; Rabek, J.F. ESR Study of degradation process in polymers. In: **ESR Spectroscopy in polymer research principles of ESR Spectroscopy**. Ed. Springer-Verlag; Berlin V.2, 1977.
11. Rosiak, J.M.; Olejniczak, J. Medical applications of radiation-formed hydrogels. **J. Radiat Phys Chem.**, 42 (4/6): 903-906, 1993.
12. Silwet Surfactants, OSI Specialties, p. 1-20, 1994. (catálogo)
13. Souza, A. et al. Influência da adição dos copolímeros de dimetilsiloxano e óxido de etileno (SEO) na tensão de ruptura (Tb), na porcentagem de gel e de intumescimento de filmes de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) reticulados por feixe de elétrons. **Anais do IV Encontro Nacional de Aplicações Nucleares**, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2: 1252-1255, Agosto, 1997.
14. **United States Pharmacopeia**, USP XXIII, Rockville, Twinbrook Parkway, 23:1697-1699, 1995.

Recebido em 03/08/1999; Aprovado em 02/12/1999

# Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato

## Sensorial differences between floral honey and honeydew honey

Gisélia CAMPOS<sup>1\*</sup>  
Regina Célia DELLA MODESTA<sup>2</sup>

RIALA 6/876

Campos, G.; Della Modesta, R.C. Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):7-14, 2000

**RESUMO.** Com a finalidade de verificar diferenças sensoriais entre mel de melato e mel floral e, identificar a presença do mel de melato misturado ao mel floral, foi aplicado o teste de diferença pareado e a determinação instrumental de cor e turbidez em várias amostras de mel. Foi tomada uma amostra de mel floral puro e uma amostra de mel de melato puro como referências. Foram elaboradas no laboratório misturas de mel floral com quantidades variadas de mel de melato para a aplicação dos testes. Na caracterização sensorial foi observado que o mel floral apresentou aroma e sabor mais característico, menor viscosidade e gosto doce mais acentuado que o mel de melato puro. Em relação às misturas, nos testes definitivos, foi observado que, entre 10 e 15%, a mistura começou a perder aroma e sabor característicos, ficou mais viscosa e mais doce. No entanto, ficou demonstrado que as amostras mostraram variabilidade sensorial. A medida de cor foi afetada pela presença de mel de melato. As medidas de turbidez e luminosidade não mostraram resultados significativos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Mel; mel de melato; análise sensorial.

### INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural de abelhas elaborado a partir do néctar das flores (mel floral), de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas (mel de melato). A origem floral do mel é determinada pela análise políica, físico-química e sensorial. Quando a quantidade de pólen é muito pequena, ou a planta é estéril, (como por exemplo lavanda híbrida) a análise sensorial é de extrema utilidade para identificar a sua origem<sup>2</sup>. O mel de melato portanto, difere do mel floral em vários aspectos, inclusive na aparência. Para obter os nutrientes necessários ao seu organismo, as abelhas utilizam os recursos disponíveis sendo estes o pólen, a água o néctar e o melato. Portanto, o mais comum

é a ocorrência de mel floral misturado com mel de melato<sup>1</sup>.

A análise sensorial pode ser um instrumento valioso para detectar a presença do mel de melato no mel floral. A cor do mel está relacionada com a sua origem, em consequência, com a sua composição, modificando-se pelo processamento e armazenamento. O escurecimento está relacionado com a reação de tanatos e outras substâncias polifenólicas com sais de ferro e também com a instabilidade da frutose em soluções ácidas. A turbidez está relacionada com os materiais em suspensão e portanto é um parâmetro de qualidade<sup>5</sup>. Com esta finalidade foram realizados testes sensoriais e instrumentais para cor e turbidez, tomando-se uma amostra de mel floral puro e uma de mel de melato puro como referência e várias misturas preparadas no laboratório.

<sup>1</sup> Serviço de Química Bromatológica – DBT/IOM – Fundação Ezequiel Dias

<sup>2</sup> EMBRAPA – Agroindústria de Alimentos

\* Endereço para correspondência: Serviço de Química Bromatológica – DBT/IOM – Fundação Ezequiel Dias – Rua Conde Pereira Carneiro 80 – Gameleira – 30510-010 – Belo Horizonte – MG

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Preparação das amostras

No caso de mel líquido ou filtrado e sendo a amostra livre de granulação, a mesma foi bem homogeneizada com o bastão de vidro.

### 2. Delineamento experimental

O Quadro 1 mostra a classificação do mel em floral e de melato conforme Campos (1998)<sup>4</sup>. Para se estudar a associação entre as categorias de mel (floral ou melato) e os aspectos quantitativos estudados (cor: L, a, b e  $\Delta E$  e turbidez), utilizou-se o teste exato de Fisher face à limitação da amostragem. Para se estudar o efeito da adição gradativa de melato no mel floral sobre os parâmetros (L, a, b,  $\Delta E$  e turbidez) foi feita uma análise de regressão para cada uma dessas características, sendo o percentual adicionado de melato a variável independente. O coeficiente de regressão encontrado foi testado pelo teste t de Student (Snedecor e Cochran, 1989)<sup>9</sup>.

**Quadro 1.** Classificação do mel em floral e mel de melato de acordo com Kirkwood e com White (Campos, 1998)<sup>4</sup>

Nº da amostra	Classificação conforme Kirkwood	Classificação conforme White
1	mel floral	mel floral
2	mel floral	mel floral
3	mel floral	mel floral
4	Mel de melato	mel de melato
5	Mel de melato	mel de melato
6	Mel de melato	mel de melato
7	Mel de melato	mel de melato
8	Mel de melato	mel de melato
9	mel floral	mel floral
10	Mel de melato	mel floral
11	mel floral	mel de melato
12	Mel de melato	mel floral
13	Mel de melato	mel de melato
14	mel floral	mel floral
15	Mel de melato	mel de melato
16	mel floral	mel floral
17	mel floral	mel floral
18	mel floral	mel floral
19	mel floral	mel floral
20	mel floral	mel floral
21	mel floral	mel floral
22	Mel de melato	mel de melato
23	Mel de melato	mel de melato
24	mel floral	mel de melato
25	mel floral	mel floral

Fonte: CAMPOS, 1998

### 3. Análise sensorial

Inicialmente foi realizada uma prova aberta com 10 provadores, selecionados anteriormente pela habilidade para discriminar gosto doce, para definição dos atributos. Foram oferecidas aos provadores amostras de mel padrão floral (amostra nº 20), padrão de melato (amostras nº 22 e 5) e

misturas de mel floral com mel de melato nas concentrações de 25, 20, 15 e 10%.

Foi realizada reciclagem dos provadores sempre que necessário.

As amostras apresentadas para treinamento, em prova aberta, foram:

- duas amostras diferentes de mel floral, ambas com predominância de pólen de eucalipto, coletadas em épocas diferentes;
- amostras de mel de melato puro e uma amostra de mel floral, para treinar os atributos que foram definidos anteriormente, aroma característico, consistência, sabor característico e gosto doce.

As amostras apresentadas também para treinamento, já aplicando o teste pareado direcional (bicaudal), foram: misturas contendo 5, 10, 15, 25, 50 e 75% de mel de melato em mel floral *versus* mel floral.

O teste sensorial definitivo foi o teste pareado direcional (bicaudal). As amostras (cerca de 4g de cada amostra/provador) foram servidas, à temperatura ambiente, em béqueres de 50mL, em bandejas de aço inox, codificadas com números aleatórios de três dígitos. Os béqueres foram envoltos em papel alumínio para não haver interferência da cor. Os provadores foram informados na ficha do teste (Quadro 2), qual a característica ou atributo sensorial a ser julgado. As duas amostras foram apresentadas juntas. Foi usada água mineral, à temperatura ambiente, e biscoito de água, para limpeza do palato.

Os testes foram realizados no laboratório de Análise Sensorial da Embrapa - Agroindústria de Alimentos, em cabines individuais, sob iluminação vermelha. Foi feito um teste pela manhã e outro à tarde, com o número de repetições necessárias.

**Quadro 2.** Ficha para avaliação sensorial de amostras de mel

TESTE PAREADO - DIFERENÇA (BICAUDAL)	
NOME: _____	DATA: _____
PRODUTO: Mel	
Por favor, marque a amostra com maior intensidade dos seguintes atributos:	
	Nº da amostra
Aroma característico	____ _
Viscosidade	____ _
Sabor característico	____ _
Gosto doce	____ _
Comentários _____	
_____	
_____	

As amostras testadas foram:

- mel floral padrão (amostra 20) *versus* misturas deste mel com mel de melato (amostra 4) nas concentrações de 20, 10 e 5% oferecidas nesta ordem.

- mel floral padrão (amostra 25) *versus* misturas deste mel com mel de melato (amostra 23) nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30% oferecidas nesta ordem.

As amostras utilizadas como referência foram classificadas como mel floral e mel de melato conforme Kirkwood e White (Campos, 1998)<sup>4</sup>. O mel de melato referência foi proveniente de Santa Catarina. Este mel é produzido de 2 em 2 anos e corresponde ao ciclo da cochonilha sendo, elaborado pelas abelhas, a partir da excreção destes afídeos, que vivem sobre o caule da bracatinga. As frequências foram avaliadas segundo Roessler et al. (1978) ao nível de 0,1%.

#### 4. Determinação instrumental da cor e turbidez

Para a análise instrumental, as amostras que apresentavam granulação foram colocadas dentro de recipientes fechados em banho-maria sem submergir, sendo as mesmas aquecidas por 30min a 60°C, agitando-se ocasionalmente.

A análise instrumental de cor foi realizada por transmissão no S & M Colour Computer modelo SM - 4 - CH da Suga, no sistema Hunter com abertura de 30mm de diâmetro. Os parâmetros medidos foram: L (luminosidade que varia de 0 = preto a 100 = branco), a (-80 ao zero corresponde ao verde, do zero ao +100 corresponde ao vermelho), b (-100 ao zero corresponde ao azul, do zero ao +70 corresponde ao amarelo),  $\Delta E$  representa a diferença total de cor =  $\sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$  e turbidez, em relação à placa de Petri (L = 100,00; a = 0,02; b = -0,02). Foram realizadas 3 repetições para cada amostra disposta em placa de Petri com 5 cm de diâmetro e 1 cm de altura, utilizando a quantidade de 25 mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na caracterização sensorial pôde-se observar que as diferenças entre amostras de mel floral e de mel de melato foram (Tabelas 1 e 2) quanto:

- ao aroma e ao sabor característico - melato ligeiramente menos característico;
- ao gosto ácido - perceptível apenas no floral;
- à viscosidade - melato mais viscoso;
- ao gosto doce - melato menos doce.

Assim, o mel floral apresentou aroma e sabor mais característico, menor viscosidade, mais sabor característico e gosto doce mais acentuado que o mel de melato puro.

Após a caracterização, durante o treinamento dos provadores, os resultados mostraram que em misturas com 5 a 75% de mel de melato em mel floral houve perda do aroma e do sabor característico do mel, além da mistura ter se mostrado não significativamente mais viscosa.

- em misturas de 5% a 75% de mel de melato em mel floral houve perda do aroma e do sabor característico de mel, nas misturas;

**Tabela 1.** Caracterização sensorial de mel floral\* (amostra 20) e mel de melato\*\* (amostra 22)

Mel	Aroma	Viscosidade	Sabor
Floral	Característico	Menos viscoso que o de melato	Característico Mais doce que o de melato Ligeiramente amargo ("ardido") Residual amargo
Melato	Característico Fumaça	Mais viscoso que o floral	Levemente salgado Fumaça (forte) Lembra melado de cana Trava nas laterais da boca como fruta verde Mais amargo que o floral Menos doce, mas enjoativo Sabor "verde" Sabor residual de melado

\*Procedência Barão de Cocais/MG contendo 60% de pólen de eucalipto

\*\*Procedência Santa Catarina proveniente da casca da bracatinga

**Tabela 2.** Caracterização sensorial de mel floral\* (amostra 20) e méis de melato\*\* (amostras 5 e 22)

Mel	Aroma	Viscosidade	Sabor
Floral (Amostra 20)	Característico	Fluido Pouco viscoso Cristalizado	Característico Levemente ácido Residual amargo
Melato (Amostra 5)	Mel, não tão característico	Mais viscoso que o mel	Lembra melado Sabor homogêneo (o mesmo desde quando coloca na boca até o final)
	Xarope caseiro	Encorpado	Levemente amargo
	Remédio	Bastante viscoso	
Melato (Amostra 22)	Fumaça	Mais viscoso que amostra 5	Sabor inicial amargo Fumaça
	Formol	Levemente mais encorpado que amostra 5	Formol Amargo
	Mel, menos característico	Bastante viscoso	Defumado

\*Procedência Barão de Cocais/MG contendo 60% de pólen de eucalipto

\*\*Procedência Santa Catarina proveniente da casca da bracatinga

**Tabela 3.** Frequência do teste pareado direcional (bicaudal) entre misturas de mel floral a (20) e b (24) contendo diferentes proporções de mel de melato - treinamento dos provadores

% de mel de melato	Aroma caract. mel x mist	Viscosidade mel x mist	Sabor caract. mel x mist	Gosto doce mel x mist	Total de testes
75 <sup>b</sup>	6 <sup>ns</sup> 1	1 6 <sup>ns</sup>	7* 0	3 4 <sup>ns</sup>	7
50 <sup>b</sup>	7* 0	0 7*	7* 0	2 5 <sup>ns</sup>	7
25 <sup>b</sup>	7* 0	1 6 <sup>ns</sup>	7* 0	4 <sup>ns</sup> 3	7
15 <sup>b</sup>	7* 0	1 6 <sup>ns</sup>	7* 0	2 5 <sup>ns</sup>	7
75 <sup>a</sup>	8* 0	1 7 <sup>ns</sup>	7* 1	4 4 <sup>ns</sup>	8
50 <sup>a</sup>	7 <sup>ns</sup> 0	1 7 <sup>ns</sup>	7 <sup>ns</sup> 0	1 7 <sup>ns</sup>	8
25 <sup>a</sup>	7 <sup>ns</sup> 0	2 5 <sup>ns</sup>	7 <sup>ns</sup> 0	0 7 <sup>ns</sup>	8
15 <sup>a</sup>	5* 0	3 <sup>ns</sup> 2	5* 0	0 5*	5
10 <sup>a</sup>	7* 0	2 5 <sup>ns</sup>	6 <sup>ns</sup> 1	5 <sup>ns</sup> 2	7
5 <sup>a</sup>	7* 0	1 6 <sup>ns</sup>	6 <sup>ns</sup> 1	1 6 <sup>ns</sup>	7

Segundo Roessler et al. (1978)<sup>5</sup>: ns - não significativo

\* - significativo ao nível de 5%



- em relação à viscosidade, embora os resultados não tenham sido significativos, houve uma tendência para a mistura ser mais viscosa, indicando que a medida de viscosidade deve ser realizada instrumentalmente, para obtenção de resultados mais precisos.

Isto pode ser confirmado pelos dados da Tabela 4 que também mostrou aumento da doçura nas misturas.

As frequências apresentadas nas Tabelas 5 e 6, referem-se à continuação do treinamento dos provadores (por isso o número baixo de testes). Mesmo assim foi possível perceber que a adição de mel de melato no mel floral a partir de 5% já permitiu detectar diferença entre os atributos definidos, mesmo quando comparado com mel floral de épocas diferentes. Nas misturas houve perda significativa do aroma e sabor característicos, e uma tendência de as mesmas serem mais viscosas.

Os testes definitivos comparando misturas de mel floral com mel de melato foram realizados com méis florais diferentes (amostra 20 e 25) e dois de melato (amostra 4 e 23). Os resultados são mostrados nas Tabelas 7 e 8. Pela Tabela 10 pode-se observar que para:

- aroma característico - a adição de 5% de melato não permitiu perceber diferença em relação ao mel floral; a partir de 10% de adição, o aroma do mel floral foi significativamente mais característico que da mistura,

ou seja, houve perda do aroma característico de mel, pela adição de mel de melato ao mel floral;

- a viscosidade - a adição de melato tornou a mistura significativamente mais viscosa, a partir de 10%;
- sabor característico - a partir de 10% de adição, a mistura foi significativamente menos característica que o mel floral, ou seja, houve perda do sabor característico de mel, pela adição de mel de melato ao mel floral;
- gosto doce - não foi possível perceber uma tendência devido a variação dos resultados; no entanto, a partir de 20% de adição de mel de melato houve apenas uma tendência aleatória de a mistura ser mais doce.

Na Tabela 8, como já explicado, foi avaliada outra amostra de mel floral, assim como de mel de melato, e o que pôde-se observar foi que, comparando-se mel floral com mistura de mel floral e mel de melato para:

- aroma característico, até 15% de adição não houve diferença em relação ao mel floral com uma tendência da mistura ser mais característica com 5 e 10% de melato; a partir dessa porcentagem, houve uma tendência de o mel floral ser mais característico do que a mistura;

**Tabela 4.** Caracterização sensorial de mel floral\* (amostra 20) e misturas de méis floral (amostra 20) com mel de melato\*\* (amostra 5 e 22)

Floral+Melato (%)	Aroma	Viscosidade	Sabor
100+0	Característico Mínima diferença entre os três Ligeiramente mais fraco Sem diferença entre os três	Não há diferença entre os três Menos viscoso Cristalizado Fluido Igual aos outros dois Característico	Característico Doce Levemente ácido Bem mais doce
95+5	Ligeiramente menos característico que o floral	Mais viscoso que o floral	Ligeiramente menos característico que o floral Mais doce que o floral Residual amargo
90+10	Melado (mel) Ligeiramente menos característico que o floral Semelhante a mistura com 5% Menos característico Menos característico Mel + melado Ausência de odor de fumaça	Igual ao floral Igual a mistura com 5% Presença de cristais de açúcar (arenoso) Semelhante ao floral 85+15	Ligeiramente menos característico que o floral Mais doce que o floral e mais doce que o 5% Residual amargo Pouco salgado Menos característico Mais salgado Mel + melado Mais doce que o floral e que o 10% Melado de cana Amargo Fumaça
80+20	Mel mais forte que o floral Sem fumaça Característico Semelhante ao floral	Mais viscoso que o floral	Menos característico Mais doce Diferença perceptível em relação ao floral
75+25	Mais forte que o floral	Mais viscoso que o floral	Menos característico Bem mais doce Ardido (picante muito diferente do floral)

\*Procedência Barão de Cocais/MG contendo 60% de pólen de eucalipto

\*\* Procedência Santa Catarina proveniente da casca da bracinga

- viscosidade, até 10% de adição houve uma tendência do mel floral ser mais viscoso do que a mistura; a partir dessa porcentagem, a tendência foi de a mistura ser mais viscosa;
- sabor característico, aconteceu o inverso da viscosidade; porém em relação à mistura com 30% de melato, o floral foi significativamente mais característico;
- gosto doce, não houve coerência à medida em que foi aumentada a concentração de mel de melato no mel floral.

Assim pôde-se notar que, nas misturas a 10 e 20% de mel de melato utilizando-se a amostra 20 de mel floral e a amostra 4 de mel de melato, o aroma e o sabor mais característicos ocorreram no mel, enquanto a viscosidade e o gosto doce foram mais acentuados na mistura.

Nas misturas com 5 e 10%, utilizando-se a amostra 25 de mel floral e a amostra 23 de mel de melato (Tabela 11), o aroma e o sabor mais característicos ocorreram na mistura enquanto a viscosidade e o gosto doce foram mais acentuados no mel.

**Tabela 5.** Frequência do teste pareado direcional (bicaudal) na comparação entre mel floral (amostra 24) e misturas de mel floral com mel de melato (amostra 23)

Mel x Mist. (F+m) (%)	Total de testes	Aroma característico Mel x Mist.	Viscosidade Mel x Mist.	Sabor característico Mel x Mist.	Gosto doce Mel x Mist.
100 x (15+75)	7	6 <sup>ns</sup> x 1	1 x 6 <sup>ns</sup>	7* x 0	3 x 4 <sup>ns</sup>
100 x (50+50)	7	7* x 0	0 x 7*	7* x 0	2 x 5 <sup>ns</sup>
100 x (75+25)	7	7* x 0	1 x 6 <sup>ns</sup>	7* x 0	4 <sup>ns</sup> x 3
100 x (85+15)	7	7* x 0	1 x 6 <sup>ns</sup>	7* x 0	2 x 5 <sup>ns</sup>

F - floral

m - mel de melato

Segundo Roesler et al. (1978)\*: ns - não significativo

\* - significativo ao nível de 5%

**Tabela 7.** Frequência do teste pareado direcional (bicaudal) na comparação entre mel floral (amostra 20) e misturas de mel floral com mel de melato (amostra 4)

Mel x Mist. (F+m) (%)	Total de testes	Aroma característico	Viscosidade	Sabor característico	Gosto doce
100 x (95+5)	16	6 x 10 <sup>ns</sup>	6 x 10 <sup>ns</sup>	7 x 9 <sup>ns</sup>	9 <sup>ns</sup> x 7
100 x (90+10)	25	18* x 7	6 x 19*	18* x 7	10 x 15 <sup>ns</sup>
100 x (80+20)	22	17* x 5	1 x 21***	18** x 4	5 x 17*

F - floral

m - mel de melato

Segundo Roessler et al. (1978)\*: ns - não significativo

\* - significativo ao nível de 5%

\*\* - significativo ao nível de 1%

\*\*\* - significativo ao nível de 0,1%

Portanto, há uma variação no comportamento das misturas dependendo dos méis utilizados.

A partir de 15% (Tabela 11), o aroma e o sabor mais característicos ocorreram no mel, indicando que houve perda desses atributos pela adição do mel de melato, o que está de acordo com o que foi percebido durante o treinamento nas Tabelas 1, 2 e 3. Enquanto a viscosidade foi mais acentuada na mistura no caso do gosto doce não houve coerência nos resultados. Isso inclusive confirma os resultados da Tabela 7.

Entre 10 e 15%, a mistura começou a perder aroma e sabor característicos, ficou mais viscosa e mais doce. No entanto, pelos resultados das Tabelas 7 e 8, ficou evidente que as amostras mostraram variabilidade sensorial. Por isto sugere-se além de novos testes sensoriais, a aplicação para um número maior de amostras de diferentes méis.

A literatura cita que correlações entre características do mel e análise sensorial, mostraram que mel escuro, com menor teor de água e maior viscosidade, apresentaram altos índices de qualidade e que estes parâmetros podem ser utilizados na determinação da qualidade do mel. Os resultados

**Tabela 6.** Frequências do teste pareado direcional (bicaudal) na comparação entre mel floral (amostra 20) e misturas de mel floral com mel de melato (amostra 23)

Mel x Mist. (F+m) (%)	Total de testes	Aroma característico	Viscosidade	Sabor característico	Gosto doce
100 x (15+75)	8	8* x 0	1 x 7 <sup>ns</sup>	7* x 1	4 <sup>ns</sup> x 4
100 x (50+50)	7	7* x 0	1 x 6 <sup>ns</sup>	7* x 0	1 x 6 <sup>ns</sup>
100 x (75+25)	7	7* x 0	2 x 5 <sup>ns</sup>	7* x 0	0 x 7 <sup>ns</sup>
100 x (85+15)	5	5* x 0	3 <sup>ns</sup> x 2	5* x 0	0 x 5*
100 x (90+10)	7	7* x 0	2 x 5 <sup>ns</sup>	6 <sup>ns</sup> x 1	5 <sup>ns</sup> x 2
100 x (95+5)	7	7* x 0	1 x 6 <sup>ns</sup>	6 <sup>ns</sup> x 1	1 x 6 <sup>ns</sup>

F - floral

m - mel de melato

Segundo Roessler et al. (1978)\*: ns - não significativo

\* - significativo ao nível de 5%

**Tabela 8.** Frequência do teste pareado direcional (bicaudal) na comparação entre mel floral (amostra 25) e misturas de mel floral com mel de melato (amostra 23)

Mel x Mist. (F+m) (%)	Total de testes	Aroma característico	Viscosidade	Sabor característico	Gosto doce
100 x (95+5)	31	12 x 19 <sup>ns</sup>	19 <sup>ns</sup> x 12	13 x 18 <sup>ns</sup>	17 <sup>ns</sup> x 14
100 x (90+10)	29	13 x 16 <sup>ns</sup>	18 <sup>ns</sup> x 11	13 x 16 <sup>ns</sup>	18 <sup>ns</sup> x 11
100 x (85+15)	29	15 <sup>ns</sup> x 14	13 x 16 <sup>ns</sup>	17 <sup>ns</sup> x 12	13 x 16 <sup>ns</sup>
100 x (85+15*)	27	21* x 06	09 x 18 <sup>ns</sup>	20* x 07	10 x 17 <sup>ns</sup>
100 x (80+20)	38	21 <sup>ns</sup> x 17	18 x 20 <sup>ns</sup>	19 <sup>ns</sup> x 14	21 <sup>ns</sup> x 17
100 x (75+25)	35	20 <sup>ns</sup> x 15	14 x 21 <sup>ns</sup>	20 <sup>ns</sup> x 15	19 <sup>ns</sup> x 16
100 x (70+30)	33	22 <sup>ns</sup> x 11	14 x 19 <sup>ns</sup>	23* x 10	13 x 20 <sup>ns</sup>

F - floral

m - mel de melato

Segundo Roessler et al. (1978)\*: ns - não significativo

\* - significativo ao nível 5%

\*\* - significativo ao nível de 1%

r = repetição

da avaliação sensorial foram considerados reprodutíveis o bastante para dar suporte à introdução de um sistema de graduação de qualidade para o mel, baseado em medidas objetivas e sensoriais<sup>7</sup>. Especificamente em relação à análise sensorial de mel de melato, a literatura é escassa.

Em relação às medidas de cor L, a, b, ΔE e turbidez (Tabela 9), para as 25 amostras analisadas foi realizado o teste exato de Fisher para verificar se o grupo de mel floral e de mel de melato estão associados com determinados valores medidos para estas variáveis. A partir das tabelas de contingência a seguir, os seguintes estudos de dispersão de frequência puderam ser feitos.

		Kirkwood		White	
		L ≤ 30	L > 30	L ≤ 30	L > 30
Floral		7	7	7	7
Melato		3	8	3	8
		p < 0,42		p < 0,42	

De acordo com Kirkwood (1960)<sup>6</sup> e com White (1980)<sup>10</sup>, sete amostras de mel floral apresentaram luminosidade menor ou igual a 30 e sete maior que 30. Três amostras de mel de melato apresentaram luminosidade menor ou igual a 30 e 8 amostras de mel de melato apresentaram luminosidade acima de 30. Estes resultados não foram significativos ao nível de 5%. Da mesma forma, em relação a turbidez e à medida de cor a, os resultados também não foram significativos, demonstrando que estas características foram independentes do tipo de mel.

		Kirkwood		White	
		a ≤ 6,4	a > 6,4	a ≤ 6,4	a > 6,4
Floral		10	4	10	4
Melato		6	5	6	5
		p < 0,44		p < 0,44	

		Kirkwood		White	
		b ≤ 18,4	b > 18,4	b ≤ 18,4	b > 18,4
Floral		7	7	8	6
Melato		3	8	2	9
		p < 0,42		p < 0,1	

		Kirkwood		White	
		turbidez ≤ 92	turbidez > 92	turbidez ΔE ≤ 92	turbidez ΔE > 92
Floral		10	4	10	4
Melato		8	3	8	3
		p < 0,21		p < 0,21	

**Tabela 9.** Valores médios da cor instrumental de amostras de mel

Amostra	L	a	b	ΔE	Turbidez	Classificação	
						Kirkwood	White
1	21,12	-5,73	4,17	79,06	99,83	Floral	Floral
2	22,62	-4,40	5,70	77,57	98,96	Floral	Floral
3	3,98	5,42	-0,16	96,19	97,90	Floral	Floral
4	26,84	32,37	18,43	81,92	91,50	Melato	Melato
5	34,80	38,56	23,89	79,42	92,00	Melato	Melato
6	77,42	4,72	30,41	38,19	35,50	Melato	Melato
7	19,40	-9,72	4,19	81,31	97,37	Melato	Melato
8	50,53	6,74	22,40	54,74	70,83	Melato	Melato
9	51,09	26,25	35,22	65,75	74,50	Floral	Floral
10	21,46	-5,51	4,53	78,72	97,34	Melato	Floral
11	73,72	1,28	31,47	41,00	47,33	Floral	Melato
12	33,16	-5,89	12,83	68,32	91,40	Melato	Floral
13	74,57	3,30	33,06	41,78	39,63	Melato	Melato
14	61,54	4,98	31,15	49,66	55,10	Floral	Floral
15	83,11	1,26	26,00	31,01	29,67	Melato	Melato
16	71,23	4,00	34,25	44,85	51,83	Floral	Floral
17	22,72	5,45	14,64	78,84	93,88	Floral	Floral
18	33,80	7,79	21,20	69,74	81,45	Floral	Floral
19	24,35	4,96	15,00	77,28	92,68	Floral	Floral
20	40,70	11,07	26,25	65,79	82,63	Floral	Floral
21	2,40	20,44	8,12	100,06	104,5	Floral	Floral
22	32,18	32,51	22,30	78,44	86,70	Melato	Melato
23	52,37	22,98	35,75	63,85	72,33	Melato	Melato
24	12,69	5,14	8,14	87,84	98,38	Floral	Melato
25	44,73	3,83	24,0	59,83	78,38	Floral	Floral

L: luminosidade (0 = preto, 50 = cinza, 100 = branco)

a: - 80 (verde) a +100 (vermelho)

b: - 100 (azul) a + 70 (amarelo)

ΔE: diferença total de cor

Contudo, em relação à medida de cor b (amarelo), de acordo com a classificação de White (1980)<sup>10</sup> cerca de 82% (9 méis do total de 11) dos méis de melato apresentaram esta medida superior a 18,4, enquanto para os méis florais 42% (6 méis do total de 14) apresentaram valor de b nesta faixa. Embora não tenha sido estatisticamente comprovado, pela limitação da amostragem, há uma associação entre mel de melato e valor de b > 18,4.

Os resultados da cor instrumental das misturas (Tabela 10), permitiram observar que, à medida que aumentou o teor de melato na mistura diminuiu a luminosidade, aumentou ligeiramente a quantidade de cor vermelha, e diminuiu sensivelmente a quantidade de cor amarela (b), significando mais marrom e portanto mais escura. Porém, nas amostras analisadas, o mel classificado como mel de melato, apresentou, no geral, b maior que o do mel floral. A turbidez também aumentou, a medida que aumentou a porcentagem de mel de melato na mistura, por isso houve diminuição da luminosidade demonstrando um escurecimento das amostras a medida que aumentou a porcentagem de mel de melato na mistura. Isto foi confirmado pela aplicação da regressão linear que mostrou aumento ou diminuição significativa no coeficiente de regressão b, nas variáveis medidas exceto na medida de cor a (Tabela 11).

**Tabela 10.** Valores médios (4 repetições) da cor instrumental de misturas de mel floral (amostra 25) com de melato (amostra 23)

Floral+Melato (%)	L	A	b	$\Delta E$	Turbidez
100+0	44,73	3,83	24,10	59,83	78,38
95+5	46,26	3,69	24,91	58,75	81,22
90+10	35,51	4,14	20,28	67,74	86,00
85+15	41,83	4,26	23,31	62,85	85,57
85+15 R	38,52	4,56	22,13	65,21	84,17
80+20*	28,36	4,77	16,90	74,04	92,10
75+25	28,34	5,81	17,57	73,95	95,27
70+30	23,45	4,78	14,97	78,14	95,62

R= repetição

\* = médias de 6 leituras

## CONCLUSÕES

A análise sensorial não permitiu detectar a presença de mel de melato no mel, em função da diferença entre as amostras de mel floral, acarretando variação nos resultados. Devido a isto, é necessário aumentar a amostragem em relação ao mel floral.

A medida de cor amarela b foi afetada pela presença de mel de melato, sendo que valores superiores a 18,4 indicaram a presença de melato nas amostras de mel analisadas. Porém, nas misturas, o valor de b diminuiu à medida que aumentou a quantidade de mel de melato.

**Tabela 11.** Análise por Regressão Linear dos resultados da análise de misturas de mel floral com mel de melato nas proporções de 5, 10, 15, 20 e 25% de mel de melato

Variável y	Coefficiente linear A	Coefficiente regressão b	Coefficiente Determinação r <sup>2</sup>
L	48,421	-0,8421*	0,8494
a	3,5180	0,06183	0,6430
b	25,9233	-0,3637*	0,8125
$\Delta E$	56,8827	0,7176*	0,8547
Turbidez	78,5160	0,6099*	0,9134

\* Resultados significativos, indicando que para cada aumento de 1% de melato, há um aumento ou diminuição de b unidades na variável y

A turbidez e a luminosidade do mel floral foram alteradas pela presença de mel de melato, porém de forma insuficiente para permitir uma diferenciação entre estes dois tipos de mel.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e à EMBRAPA pelos recursos técnicos.

RIALA 6/876
-------------

Campos, G.; Della Modesta, R.C. Sensorial differences between floral honey and honeydew honey. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):7-14, 2000

**ABSTRACT.** The paired comparison test and the instrumental determination of colour and turbidity were applied to identify the presence of honeydew honey in various honey samples. The references used were a pure floral honey and a pure honeydew honey. Mixtures containing both of them were made at the laboratory to run the tests. The sensorial characterization showed the floral honey presented a more characteristic flavor, less viscosity and it was sweeter than honeydew honey. The definitive test indicated that between 10 and 15% the mixture started to lose its characteristic flavor, became more viscous and sweeter than the floral honey. In fact samples showed sensorial variability. The measure of colour was affected by the presence of honeydew honey. Turbidity and luminosity did not show significant results.

**KEY WORDS.** Honey; honeydew honey; sensorial evaluation.

## REFERÊNCIAS

- Barth, O.M. Análise microscópica de algumas amostras de mel 5: melato (honeydew) em mel de abelhas. **Rev. Brasil. Biol.**, 30(4): 601-608, 1970.
- Bouseta, A.; Collin, S.; Dufour, J.P. Characteristic aroma profiles of unifloral honey obtained with a dynamic headspace GC-MS System. **J. of Apicultural Research**, 31: 96-109, 1992.
- Della Modesta, R.C. **Manual de Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas**, tomos I, II, III, CTA, EMBRAPA, R.J., 1994.
- Campos, G. **Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologias**. Belo Horizonte, 1998 (Tese de Doutorado - Escola de Veterinária, UFMG).
- Huidobro, J.F.; SIMAL, J. Determination del Color y de la Turbidez en las mieles. **Anal. Bromatol.** 36 (2): 225-245, 1984.
- Kirkwood, K.C.; Mitchell, T.J.; Smith, D. An examination of the occurrence of honeydew in honey. **Analyst**, 85: 412-416, 1960.
- Pechhacker, H.; Soelkner, J. Studies on the question of sensory evaluation of honey. Mittelgen- klosterneuburg, - Rebe-und-Wein, - Obstbau - und - Fruechterewertung. 6 (37):254-257, 1987. *Apud* FSTA 1969-12/95.

8. Roessler, E.B. et al. Expanded Estatistical Tables For Estimating Significance In Paired Preference, Paired difference, duo-trio and triangle tests. **J. Food Sci.**, 43 (3): 940-943, 1978.
9. Snedecor, G.W.; Cochran, W.G. **Statistical Methods**. 8 ed., Ames: Iowa State University Press. 1989. 503 p.
10. White Jr., J.W. Detection of Honey Adulteration By Carbohydrate Analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63 (1): 11-18, 1980.

Recebido em 18/05/1999; Aprovado em 06/04/2000

## Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Evaluation of the use of microtitre plate technique to determine the minimal inhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* strains

Maria Alice S. TELLES<sup>1\*</sup>  
Alessandra MOSCA<sup>1</sup>

RIALA6/877

Telles, M.A.S.; Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):16-19, 2000

**RESUMO.** A técnica de microdiluição em placa, para determinação da concentração inibitória mínima, foi comparada com as técnicas de macrodiluição em tubo e radiométrica. A padronização da microtécnica visou sua utilização em ensaios de drogas alternativas e novos compostos com potencial ação antimicrobiana contra o *Mycobacterium tuberculosis*. A droga utilizada, isoniazida, foi testada na cepa padrão H<sub>37</sub>R<sub>a</sub> e em 34 cepas de teste, sendo 26 sensíveis a isoniazida e oito resistentes, segundo perfil de sensibilidade determinado pelo método da taxa de resistência. A comparação entre os métodos em placa e o radiométrico resultou na concordância de 32 cepas e discordância de três. Estes dados indicam que o método de microdiluição em placa é adequado para se testar o efeito de drogas ou compostos químicos sobre o *M. tuberculosis*. A técnica é econômica, de fácil execução e não requer equipamento para sua execução.

**PALAVRAS-CHAVE.** Concentração inibitória mínima; *Mycobacterium tuberculosis*; resistência a drogas; microdiluição em placa.

### INTRODUÇÃO

A tuberculose, apesar de ser uma das doenças mais antigas que acometem o homem, tem apresentado novos desafios ao mundo moderno, de modo que novas metodologias precisam ser desenvolvidas para serem aplicadas pelos laboratórios.

Atualmente, o que mais preocupa as autoridades de saúde em relação à tuberculose é a questão da resistência às drogas correntemente utilizadas no tratamento.

Os métodos laboratoriais convencionais de determinação da sensibilidade às drogas das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* demandam um tempo excessivo para a obtenção do resultado. Por outro lado, os métodos mais modernos e eficientes como, por exemplo, o método radiométrico<sup>1,2,3,4,5</sup> e Mycobacteria Growth Indicator Tube<sup>6</sup>, apresentam custo elevado inviabilizando sua utilização de maneira ampla e descentralizada, especialmente em países pobres onde a tuberculose e, freqüentemente, o problema da resistência são mais agudos e com maior amplitude.

<sup>1</sup> Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central – Seção de Bacteriologia – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP

A necessidade de novas drogas ativas é urgente e tem causado renovado interesse, tanto em testar moléculas derivadas de tuberculostáticos já conhecidos<sup>7</sup>, quanto na busca de novas substâncias isoladas de extratos de vegetais<sup>8</sup> ou de fermentação microbiana.

O Brasil, com sua enorme biodiversidade, apresenta grande potencial para a descoberta de novas moléculas ativas em micobactérias e outros agentes infecciosos. A quantidade de substâncias candidatas a serem uma nova droga para tratamento da tuberculose é enorme. Desta forma, será importante a utilização de um teste para esta triagem que apresente rapidez, simplicidade e que seja padronizado, além de condizente com as condições de infra-estrutura do país.

Por não haver método convencional padronizado para as novas drogas, ou mesmo para algumas das drogas alternativas do tratamento da tuberculose, é que a utilização de metodologia que determine a concentração inibitória mínima (CIM) é a mais indicada.

O método de determinação de CIM por microdiluição em placa tem sido empregado para determinar o perfil de resistência de micobactérias a antimicrobianos. Em decorrência da simplicidade tecnológica e baixo custo, o teste contém alto potencial de utilização universal<sup>9,10,11,12</sup>.

O objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de microdiluição em placa, visando sua utilização em ensaios de drogas alternativas e novos compostos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, bem como sua comparação com os métodos radiométrico e macrodiluição, em tubo, já padronizados, e que utilizam meio líquido<sup>13</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Microrganismos

Foram utilizadas, para os testes, a cepa padrão avirulenta, de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>a</sub> (ATCC25177) e 34 cepas de *M.tuberculosis* de isolamentos clínicos realizados no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz. As cepas possuíam seu perfil de sensibilidade a isoniazida previamente determinado pelo método da taxa de resistência, método convencional em meio sólido, tendo sido incluídas 26 sensíveis e oito resistentes. A cepa padrão também mostrou-se sensível. A partir de culturas em meio sólido Lowenstein-Jensen, as cepas foram cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 adicionado de enriquecimento Albumina-Dextrose-Catalase (ADC), incubada a 37°C por 7 dias. A padronização do inóculo foi obtida por novo subcultivo em meio líquido Middlebrook 7H9, sendo o crescimento bacteriano medido diariamente em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 540 nm, até que a suspensão bacteriana atingisse leitura equivalente a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias. A suspensão resultante foi diluída a 1:10 e 1:100 com água destilada, sendo as duas diluições utilizadas como suspensão padronizada para inoculação nas três técnicas testadas.

### 2. Antimicrobiano

A isoniazida (INH) foi utilizada como agente inibitório do crescimento bacteriano, nas concentrações de: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µg/ml.

### 3. Definição da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A CIM foi definida como a menor concentração da droga na qual não se observou crescimento bacteriano. A cepa foi considerada sensível à isoniazida quando apresentou CIM menor do que 0,2 µg/ml.

#### 3.1 Método clássico de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) em meio líquido

Empregou-se a técnica descrita por Ericsson e Sheris<sup>13</sup> sendo utilizados tubos com 5 ml de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC contendo as diferentes concentrações de INH, bem como tubos controles sem INH. Os tubos foram inoculados com 0,5 ml da suspensão bacteriana padronizada. A leitura foi realizada pela verificação visual do crescimento bacteriano após 17 dias de incubação a 37°C.

#### 3.2 Método de determinação de CIM em placa de microdiluição

Em placas estéreis de 96 orifícios foram distribuídos 100 µl de meio Middlebrook 7H9<sup>10</sup>. Na linha A da placa foi adicionado 100 µl de uma solução INH com concentração de 3,2 µg/ml. Em seguida, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100 µl da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha G da placa, sendo que a última linha H foi deixada sem droga, utilizada como controle do crescimento bacteriano. Foram inoculados 10 µl da suspensão bacteriana padronizada em cada um dos orifícios da placa. A placa foi selada com um filme selador, e incubada por 20 dias e a leitura feita visualmente.

#### 3.3 Método de determinação de CIM utilizando o método radiométrico

A técnica utilizada é a descrita por Siddiqi, S.H. et al.<sup>3</sup>. A partir de uma solução de Isoniazida 1% foram feitas diluições até obter as concentrações necessárias para que ao se adicionar ao frasco de meio 7H12 (BACTEC 12B, Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Sparks, Md), que contém 4 ml de meio, fosse atingida a concentração final desejada. Aos tubos contendo 4 ml de 7H12 foram adicionados 0,1 ml de solução de INH. Em cada frasco de meio 7H12 foi inoculado 0,1 ml da suspensão bacteriana padronizada. O frasco foi incubado a 37°C e a leitura em equipamento BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Sparks, Md) foi feita diariamente, sendo o crescimento expresso em índice de crescimento (GI). Por esta técnica está padronizado que quando o GI atinge valores entre 400 e 600, a suspensão bacteriana pode ser então empregada para a realização de testes de avaliação de efeito de antimicrobianos. Os frascos contendo INH foram inoculados com 0,1 ml desta suspensão

bacteriana e também em um frasco sem droga que foi utilizado como controle do crescimento bacteriano. O controle foi inoculado com a suspensão bacteriana diluída 1:100. Os frascos foram incubados a 37°C e as leituras feitas no equipamento BACTEC diariamente, a partir do terceiro dia de incubação, até que o frasco controle apresentasse leitura de GI igual a 30. No dia que o GI atinge o valor maior ou igual a 30, calcula-se o Δ GI, sendo o Δ GI calculado com dados do dia anterior<sup>3</sup>.

### 3.4 Método de determinação de CIM utilizando corante Alamar Blue

Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 orifícios preparadas de maneira similar ao método de determinação de CIM<sup>9</sup>. O crescimento de *M.tuberculosis* foi detectado após a adição de um corante indicador de óxido redução, o Alamar Blue<sup>9</sup>. Neste método, a placa é preparada de modo que cada orifício contém um total de 200 µl da mistura de meio de cultura, droga e suspensão bacteriana. Após 15 dias de incubação, foi adicionado a cada orifício 25 µl de Alamar Blue, preparado em solução 1:1 de tween 80 a 10%. A placa foi reincubada por 24 horas, sendo, então, observado o aparecimento de cor. Nos orifícios cuja cor do corante mudou para rosa o teste foi considerado positivo e negativo se a cor permaneceu azul.

## RESULTADOS

As oito cepas resistentes pelo método convencional apresentaram-se resistentes nos métodos de placa e radiométrico, enquanto que no método em tubo 6 cepas tiveram resultado discordante. Das 27 cepas sensíveis, duas tiveram resultado discordante no método de placa, apresentando concentrações inibitórias mínimas maior ou igual a 0,2 µg/ml, enquanto que os métodos radiométrico e de tubo apresentaram uma cepa discordante.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados das concentrações inibitórias mínimas obtidas nos três métodos testados, mostrando que:

- a comparação dos resultados dos métodos em placa e radiométrico evidenciou 32 cepas concordantes e três discordantes, enquanto que a microdiluição quando comparada com a macrodiluição resultou em 26 cepas concordantes e 9 discordantes.
- o método radiométrico em comparação ao método em tubo apresentou 27 resultados concordantes e 8 discordantes.

A avaliação de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo dos métodos testados em relação ao método convencional estão apresentados na Tabela 2.

A Figura 1 apresenta a comparação dos resultados de CIM entre os métodos radiométrico e de placa, mostrando boa correlação entre os dois métodos.

A análise do tempo decorrido, para cada teste, na obtenção de resultado, mostrou que o método radiométrico foi o mais rápido, requerendo sete dias, sendo que para os métodos em

tubo e em placa foram necessários 17 e 20 dias respectivamente.

A utilização do corante Alamar Blue melhorou a visualização do crescimento bacteriano, e os resultados obtidos com e sem adição do Alamar Blue foram concordantes.

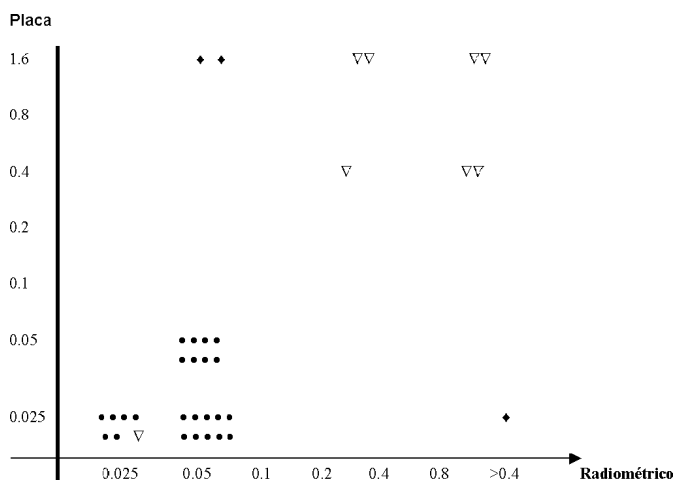
**Tabela 1.** Comparação das Concentrações Inibitórias Mínimas (µg/ml) da Isoniazida, de cepas sensíveis e resistentes, obtidas nos três métodos

cepas sensíveis n = 27				cepas resistentes n = 8			
n° cepas	placa	radiom.	Tubo	n° cepas	placa	radiom.	tubo
8	0,050	0,050	0,050	1	1,600	0,400	<u>0,10</u>
4	0,025	0,025	0,025	2	1,600	>0,400	<u>0,05</u>
5	0,025	0,050	0,025	1	1,600	0,400	<u>0,05</u>
2	0,025	0,025	0,050	1	0,025	0,025	<u>0,10</u>
2	0,025	0,050	0,050	1	0,400	>0,400	0,80
2	0,025	0,050	0,100	1	0,400	>0,400	0,40
1	0,025	0,050	<u>0,200</u>	1	0,400	0,400	<u>0,05</u>
1	<u>1,600</u>	0,025	0,050				
1	<u>1,600</u>	0,050	0,050				
1	0,025	<u>&gt;0,400</u>	0,025				

Valores grifados indicam discordância de valores em relação aos outros métodos

**Tabela 2.** Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo dos métodos de placa, radiométrico e tubo em relação ao método convencional

	Placa	Radiométrico	Tubo
Sensibilidade	93	96	93
Especificidade	86	87	25
Valor preditivo positivo	96	96	81



- ▽ cepas resistentes pelo método convencional
- cepas sensíveis pelo método convencional
- ◆ cepas com resultados discordantes entre os métodos radiométrico e em placa

**Figura 1.** Comparação das Concentrações Inibitórias Mínimas de Isoniazida obtidas nos métodos de placa e radiométrico



## DISCUSSÃO

A necessidade de padronização de um teste simples e econômico para determinação de concentração inibitória mínima de novas drogas e de drogas alternativas ao tratamento de primeira linha da tuberculose, e de novas moléculas ativas com potencial atividade sobre o *M. tuberculosis*, nos levaram a avaliar o método de microdiluição em placa, comparando-o com o método convencional e padronizado para determinação de sensibilidade às drogas, o método da taxa de resistência. Como o método em placa utiliza meio líquido, havia a necessidade de ser comparado, portanto, com métodos padronizados que utilizassem meio líquido, e por esta razão foi comparado com os métodos radiométrico e o de diluição em tubo.

A avaliação da sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo evidenciaram que os métodos de placa e radiométrico apresentam valores muito equivalentes, sendo que o método em tubo apresentou desempenho insuficiente nos valores de especificidade e de valor preditivo positivo. Os valores de sensibilidade mostraram-se altos para os três métodos, 93 a 96%, no entanto os valores de especificidade foram mais baixos, 86% para placa, 87% para radiométrico, sendo que o método em tubo apresentou valor de especificidade extremamente baixo, 25%. O valor preditivo positivo foi muito bom para os métodos em placa e radiométrico (96%) e baixo para o método em tubo (81%). O coeficiente de Kappa, calculado para o método em placa foi de 0,70 recebendo a classificação de substancial e para o método radiométrico o coeficiente apresentou o valor de 0,84 recebendo a classificação de quase perfeito. Esta análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa EPI-INFO, versão 6.04b (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, E.U.A.)

Por esta análise conclui-se que os métodos em placa e radiométrico são os que apresentaram melhores resultados, sendo que em relação às discordâncias, os dois métodos foram totalmente comparáveis, o método radiométrico resultou em dois discordantes e o de placa três.

O método em tubo, além de ser muito trabalhoso, acarreta erros maiores de diluição das drogas, e os resultados mostraram menor concordância.

Os métodos radiométrico e em placa mostraram-se mais adequados para a determinação de CIM. No entanto o radiométrico apresenta custo elevado para as condições laboratoriais de países em desenvolvimento, exigindo, ainda, equipamento específico, fator limitante em muitos laboratórios. Além disso, utiliza materiais importados e radioativos, acarretando dificuldades de aquisição e descarte dos mesmos.

O método em placa apresenta várias vantagens como: baixo custo, não exigir equipamento específico para sua realização e não utilizar material importado ou radioativo.

O método radiométrico, no presente estudo, apresentou um tempo de obtenção do resultado reduzido em 10 dias em relação ao método em placa.

Apesar de outros estudos mostrarem que os resultados utilizando-se o método em placa podem ser obtidos em 7 a 10 dias<sup>9,10</sup>, no presente trabalho o retardamento no crescimento bacteriano ocasionou um acréscimo de dias para a obtenção dos resultados. Isto pode ser devido à característica intrínseca do *Mycobacterium tuberculosis*, que apresenta tempo de crescimento em meio de cultura bastante variável.

Os dados obtidos neste estudo indicam que o método de microdiluição em placa é adequado para determinação da CIM, testar a sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* frente a diferentes drogas e principalmente é prático e econômico, podendo ser utilizado em larga escala em laboratórios de países com baixos recursos tecnológicos.

## AGRADECIMENTOS

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

RIALA6/877

Telles, M.A.S.; Mosca, A. Evaluation of the use of microtitre plate technique to determine the minimal inhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 15-19, 2000

**ABSTRACT.** The microtitre plate method used to determine the minimal inhibitory concentration has been compared with the method of tube macrodilution and the radiometric method, for the purpose of evaluating this method in testing second-line drugs and new compounds which may have a potential effect against *Mycobacterium tuberculosis*. The drug used was isoniazid and 34 strains were tested, besides the standard strain H<sub>37</sub>R<sub>0</sub>. Out of those strains, 26 were sensitive to isoniazid and eight were resistant to it. The results obtained showed that the plate method gave 32 concordant results and three discordant ones. There was a good correlation between the results of these methods and the results of the radiometric method. The sensitivity and specificity of this method were good, being very similar to the ones for the radiometric method. The conclusion is that the microdilution plate method is appropriate to test the effect of drugs or

compounds against *M.tuberculosis*. It is an inexpensive technique that is easy to perform and does not require any equipment in its use.

**KEY WORDS.** Minimal inhibitory concentration; *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance.

---

## REFERÊNCIAS

1. Inderlied, C.B; Salfinger, M. Antimicrobial agents and susceptibility tests: mycobacteria. In: Murray, P.R. et al. (ed), **Manual of Clinical Microbiology**. 6th ed. Washington : ASM Press, 1995. p.1385-1404.
2. Roberts, G.D. et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 18: 689-696, 1983.
3. Siddiqi, S.H.; Libonati, J.P.; Middlebrook, G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 13: 908-912, 1981.
4. Siddiqi, S.H.; Hawkins, J.E.; Laszlo, A. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. **J. Clin. Microbiol.**, 22: 919-923, 1985.
5. Snider, D.E. et al. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 123: 402-406, 1981.
6. Palaci, M. et al. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 762-764, 1996.
7. Sato, D.N. **Avaliação da atividade microbiana "in vitro" de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis***. São Paulo, 1998. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
8. Cantrel, C.L. et al. Antimycobacterial activity of crude plant extracts from South, Central and North America. **Phytomedicine.**, 5(2): 137-45, 1998.
9. Franzblau, S.G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 362-366, 1998.
10. Collins, L.A.; Franzblau, S.G. Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, 41: 1004-1009, 1997.
11. Wallace Jr, R.J. et al. Susceptibility Testing of Slowly Growing Mycobacteria by a microdilution MIC Method with 7H9 Broth. **J. Clin. Microbiol.**, 24: 976-981, 1986.
12. Telles, M.A.S.; Yates, M.D. Single and double drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by a micro-dilution broth medium minimum inhibitory concentration (MIC) method. **Tubercle and Lung Disease.**, 75: 286-290, 1994.
13. Ericson, H.M.; Sheris, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 217: 3-90, 1971.

Recebido em 08/09/1999; Aprovado em 04/05/2000

## Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência

Occurrence of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography

Guilherme PRADO<sup>1\*</sup>  
Marize S. de OLIVEIRA<sup>1</sup>  
Mariem R. da CUNHA<sup>1</sup>  
Maria de Fátima GOMIDES<sup>1</sup>  
Fabiana M. ABRANTES<sup>2</sup>  
Luciana G. dos SANTOS<sup>2</sup>  
Thaís VELOSO<sup>2</sup>  
Rita E. de S. BARROSO<sup>3</sup>

RIALA6/878

Prado, G. et al. Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 59 (1/2):21-25, 2000

**RESUMO.** Patulina é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos (*Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys*), principalmente pelo *Penicillium expansum*, fungo presente nas maçãs podres. É um composto tóxico, que em experimentos com animais tem demonstrado ter atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica. O conteúdo de patulina em suco de maçã é um bom indicador da qualidade das maçãs utilizadas no processamento. Treze marcas comercializadas em Belo Horizonte / Minas Gerais foram coletadas entre março e setembro de 1999. A metodologia utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. Patulina foi extraída com acetato de etila e o extrato foi purificado por partição com solução de carbonato de sódio. A separação e quantificação foi realizada em um cromatógrafo líquido por meio de uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (3 µm) e detector de ultravioleta a 278 nm. Patulina e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) foram completamente separados utilizando como fase móvel 0,8% tetrahidrofurano em água contendo 0,02% de azida de sódio em uma vazão de 0,5 mL/minuto. O limite de detecção foi < 5 µg/L. Foram obtidas recuperações média de patulina superiores a 73% e coeficientes de variação menores que 7%. Patulina foi detectada em apenas uma amostra (10 µg/L). Apesar da baixa incidência de patulina em suco de maçã neste estudo, autoridades brasileiras de saúde devem continuar a monitorar estes produtos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Maçã; suco de maçã; patulina; CLAE.

<sup>1</sup> Fundação Ezequiel Dias – Instituto Octávio Magalhães

<sup>2</sup> Bolsistas do CNPq

<sup>3</sup> Farmacêutica – Estagiária da Faculdade de Farmácia / UFMG

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

## INTRODUÇÃO

Patulina é um metabólito secundário produzido por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys*, em condições de alta atividade de água (0,95-0,99) e temperatura de 0-31 ° C e que podem contaminar frutas e alguns vegetais<sup>10,20,23</sup>.

Patulina é tóxica e produz tumores em ratos no local de aplicação quando injetado por via subcutânea<sup>8</sup>, tendo demonstrado atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica em vários experimentos com animais<sup>7, 17</sup>.

Os alimentos mais susceptíveis à contaminação por patulina na dieta humana são as maçãs e seus produtos (purê e sucos)<sup>24</sup>. Embora a contaminação com patulina esteja primariamente associada com áreas de tecido podre, ela pode penetrar cerca de 1 cm em região sadia da fruta<sup>16,26</sup>. Desta forma, a determinação de patulina pode ser utilizada como um indicador de qualidade em sucos de maçãs processados e produtos de frutas, desde que quantidade apreciável de toxina possa estar presente no alimento<sup>5</sup>.

Admitindo a toxicidade da patulina, autoridades de saúde de diversos países têm estabelecido uma concentração máxima de 50 µg/L, em suco de maçã convenientemente diluído para consumo. A Organização Mundial de Saúde tem adotado o mesmo nível<sup>9</sup>. O Brasil não tem legislação que estabeleça níveis permitidos de patulina em alimentos.

Estudos conduzidos em diferentes países revelaram uma incidência de patulina, principalmente em produtos de maçã, em níveis geralmente baixos<sup>12,19,22,28</sup> e ocasionalmente elevados<sup>5</sup>.

Os métodos que têm sido desenvolvidos para quantificação de patulina em suco de maçã incluem principalmente cromatografia em camada delgada (CCD)<sup>11,21</sup> e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>14, 18, 27</sup>.

Entretanto, substâncias interferentes co-extraídas, como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), têm afetado a quantificação de patulina em suco de maçã e devem ser considerados na metodologia analítica empregadas rotineiramente, principalmente porque os níveis de 5-HMF são o dobro ou o triplo dos níveis normalmente detectados de patulina<sup>2,12</sup>.

O objetivo deste trabalho foi verificar os níveis de patulina, em suco de maçã consumidos no Brasil, por cromatografia líquida de alta eficiência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostragem e tratamento da amostra

Todas as marcas disponíveis de suco de maçã foram coletadas em supermercados de Belo Horizonte/MG, no período de março a setembro de 1999. As amostras foram utilizadas diretamente para análise ou previamente centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e diluídas como recomendado para consumo. As análises foram efetuadas em triplicata.

### 2. Metodologia

#### 2.1 Dissolução do padrão e determinação da concentração da solução padrão de patulina

Foi dissolvido 5 mg de patulina (Sigma) em 25 mL de acetato de etila. Pipetou-se 250 µL para balão volumétrico de 5 mL e o solvente foi evaporado até secura em atmosfera de nitrogênio. Imediatamente adicionou-se álcool etílico absoluto, agitou-se em ultra-som e completou-se o volume com álcool etílico absoluto. A partir do registro do espectro na região do ultravioleta da solução padrão, foi lida a absorvância a 278 nm (pico máximo) e determinada a concentração de patulina a partir de seu peso molecular (154) e absorvidade molar, 1460<sup>1,9</sup>.

#### 2.2 Determinação da recuperação de patulina adicionada ao suco de maçã

Amostra de suco de maçã, isenta de patulina, foi contaminada, em triplicata, em quantidades variáveis de solução padrão de patulina (10,72 a 85,72 µg/L), cuja concentração foi determinada como descrito no item 2.1. Em seguida procedeu-se a extração da patulina.

#### 2.3 Determinação de patulina em suco de maçã

Foi utilizado o método descrito por Brause et al.<sup>4</sup>. A patulina foi extraída com acetato de etila e purificada por partição com solução de carbonato de sódio. O resíduo de água do extrato da amostra foi removido com sulfato de sódio anidro e, após evaporação do acetato de etila, a patulina foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção a 278 nm. A identificação da patulina foi feita comparando-se o tempo de retenção e os espectros obtidos no detector por arranjo de diodos das soluções padrões de patulina e soluções das amostras. Para limpeza da coluna, 50 µL de solução acética ácida (pH = 4) foi injetada entre repetições de cada amostra. A determinação foi feita em triplicata e cada repetição foi injetada duas vezes.

#### 2.4 Instrumental

##### 2.4.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência

Foi utilizado o equipamento Shimadzu, modelo LC-10AD, equipado com injetor automático (50 µL), detector de ultravioleta SPD-10AV e detector por arranjos de diodos para confirmação de patulina.

##### 2.4.2 Coluna

A coluna utilizada foi a de fase reversa Techsphere C<sub>18</sub>, 250 mm x 4,6 mm diâmetro interno, de 3 µm o diâmetro da partícula, operada a 30°C e precedida por uma coluna de guarda C<sub>18</sub> de 25 mm x 4,6 mm o diâmetro interno. Após as injeções no final do dia, a coluna era lavada com acetonitrila: água (60:40) por 2 horas para limpeza.

##### 2.4.3 Fase móvel

Solução aquosa de tetrahidrofurano 0,8% contendo 0,02% de azida de sódio, filtrada previamente em membrana

de celulose regenerada de 0,45  $\mu\text{m}$  e 15 mm de diâmetro, a uma vazão de 0,5 mL/min. Os solventes utilizados eram grau cromatografia líquida e a água foi purificada pelo sistema de ultrafiltração (Barnstead). Durante toda a análise era borbulhado gás hélio na fase móvel.

### 2.5 Verificação da eficiência da coluna para separação de patulina e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)

Transferiu-se 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de patulina e 100  $\mu\text{L}$  da solução de 5-HMF (5 mg/25 mL acetato de etila) para um balão volumétrico de 10 mL. Evaporou-se até resíduo em atmosfera de nitrogênio e diluiu-se com solução acética ácida (pH = 4). Injetou-se então 50  $\mu\text{L}$  dessa solução no cromatógrafo líquido<sup>15</sup>.

### 2.6 Cálculo

A quantificação de patulina foi feita por padronização externa, utilizando-se uma curva padrão com soluções contendo 0,0625, 0,125, 0,25, 0,50 e 1,0 ng/ $\mu\text{L}$  de patulina, preparadas em solução acética ácida (pH = 4). A partir do cálculo da área do pico da patulina do extrato da amostra e das soluções padrão, foi calculado o teor de patulina na amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Separação entre patulina e 5-HMF

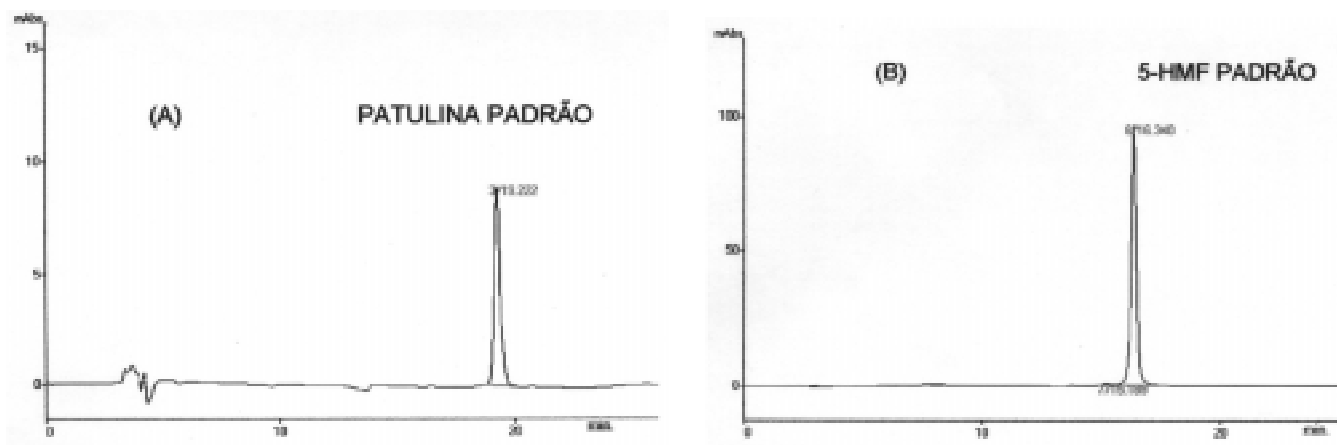
Pelos cromatogramas apresentados nas Figuras 1 e 2, observa-se que a fase móvel e a coluna utilizada, com o diâmetro da partícula de 3  $\mu\text{m}$ , possibilitaram uma última separação entre patulina e 5-HMF. Os tempos de retenção foram 16,34 e 19,21 minutos, para 5-HMF e patulina, respectivamente.

### 3.2 Recuperação

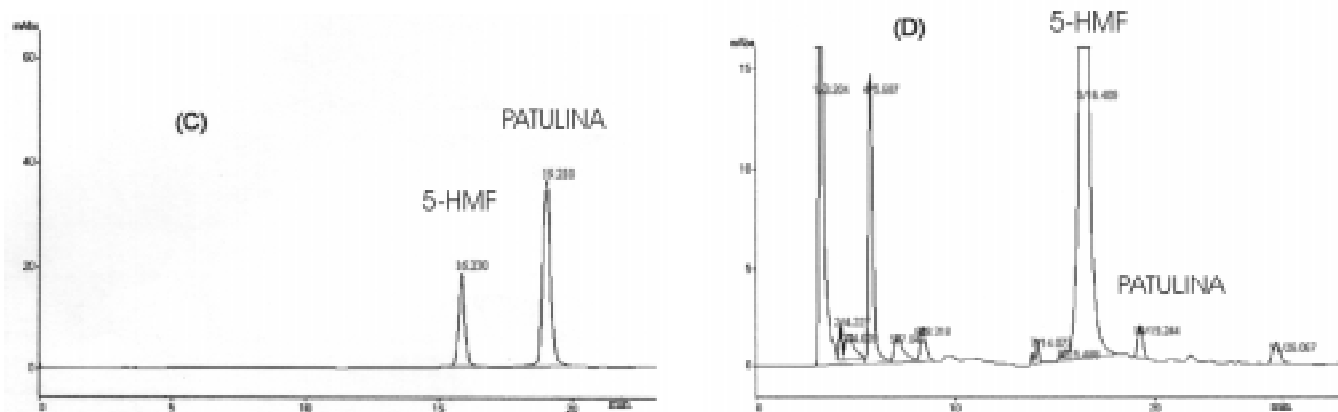
Os resultados de recuperação e coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que os valores de recuperação variaram de 73,8 a 78,3% e os coeficientes de variação (C.V.) de 1,8 a 7,0%, demonstrando a adequação do método na quantificação de patulina em suco de maçã. Segundo Horwitz et al.<sup>15</sup>, valores de recuperação acima de 70% e C. V. até 30% são aceitáveis para qualquer contaminante ao nível de  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . O valor médio de recuperação para patulina (76,1%) pode ser explicado, em parte, porque a vitamina C, componente do suco de maçã, na forma natural ou adicionado, parece reagir com patulina<sup>3,4</sup>.

### 3.3 Ocorrência

Foram analisadas 13 amostras de suco de maçã e a patulina foi detectada em apenas uma amostra, com uma concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Tabela 2). A baixa incidência de patulina pode ser devido à presença de vitamina C ou dióxido de enxofre, normalmente encontrados no suco de maçã e que reagem com a patulina<sup>3,4,6</sup>. Sylos e Rodriguez-Amaya<sup>25</sup>, em 1999, também detectaram patulina em apenas uma amostra de suco de maçã de 30 comercializadas, em Campinas, SP. Entretanto, Mancnisky e Mídio<sup>19</sup> analisaram no período de janeiro/1992 a abril/1993, 76 amostras de suco de maçã coletadas na cidade Maringá (Paraná) e detectaram patulina em 15 (21%), com média de 15,38  $\mu\text{g}/\text{L}$  e faixa de concentração de 6,4–77,5  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Essa variação nos níveis de contaminação de patulina em suco de maçã no Brasil revelam a necessidade da continuidade do monitoramento pelas indústrias e órgãos de fiscalização, uma vez que a presença de patulina decorre do crescimento de fungos em maçãs podres durante o armazenamento<sup>26</sup>. Todos os trabalhos citados utilizaram como metodologia de análise a cromatografia líquida de alta eficiência.



**Figura 1.** Cromatograma característico de (A) padrão de patulina (B) padrão de 5-hidroximetilfurfural. Condições cromatográficas: coluna  $C_{18}$  (3 $\mu$ ), 250 mm x 4,6 mm; guarda coluna  $C_{18}$  de 25 mm x 4,6 mm; Fase móvel: 0,8% tetrahydrofurano em água com 0,02% azida de sódio; Vazão: 0,5ml/min; Detecção: 278 nm



**Figura 2.** Cromatograma característico de (C) Mistura de 5-hidroximetilfurfural e patulina (D) Suco de maçã naturalmente contaminado. Condições cromatográficas: coluna C<sub>18</sub> (3μ), 250 mm x 4,6 mm; guarda coluna C<sub>18</sub> de 25 mm x 4,6 mm; Fase móvel: 0,8% tetrahidrofurano em água com 0,02% azida de sódio; Vazão: 0,5ml/min; Detecção: 278 nm

**Tabela 1.** Recuperação e coeficientes de variação de patulina em suco de maçã

Nível de Contaminação (μg/L)	Valor Encontrado (μg/L)	Média (μg/L)	Recuperação <sup>1</sup> (%)	Coefficiente de Variação (%)
10,72	8,20	8,4	78,30	5,6
	8,00			
	8,90			
21,43	16,97	16,7	77,90	1,8
	16,36			
	16,68			
42,86	30,00	32,6	76,00	7,0
	34,40			
	33,36			
76,40	56,90	56,4	73,80	5,1
	59,00			
	53,30			
85,73	66,80	63,8	74,50	4,0
	62,49			
	62,22			

<sup>1</sup> Recuperação Média: 76,1%

Os níveis de contaminação de patulina em suco de maçã consumidos no Brasil são inferiores quando comparados aos descritos em outros países. Na Austrália, Burda<sup>5</sup> e Watkins et al.<sup>28</sup> detectaram patulina em 58% e 65% das amostras analisadas, respectivamente. Cerca de 50% das amostras contaminadas apresentavam níveis de patulina superiores a 50 μg/L. Na Espanha, Prieta et al.<sup>22</sup> detectaram patulina em 82% das amostras, sendo que em 75% a concentração foi inferior a 10 μg/L. Trabalhos desenvolvidos por Gokmen e Acar<sup>12,13</sup> na Turquia revelaram presença de patulina em suco de maçã, na quase totalidade das amostras.

**Tabela 2.** Níveis de patulina em amostras de suco de maçã coletadas em Belo Horizonte/Minas Gerais, em 1999

Marca	Origem	Embalagem	Resultado <sup>1</sup> (μg/L)	Presença de vitamina C
A	México	Lata	ND	S
B	México	Tetra Pak	ND	S
C	México	Tetra Pak	ND	S
D	Coréia	Lata	ND	S
E	Portugal	Tetra Pak	ND	S
F	Argentina	Tetra Pak	ND	S
G	Bahia	Tetra Pak	ND	S
H	Rio de Janeiro	Tetra Pak	ND	S
I	Minas Gerais	Tetra Pak	10,0	S
J	Rio Grande do Sul	Tetra Pak	ND	S
L	São Paulo	Tetra Pak	ND	S
M	Ceará	Vidro	ND	N
N	Rio Grande do Sul	Tetra Pak	ND	S

<sup>1</sup> Triplicata

ND - Não Detectado. Limite de Detecção: < 5 μg/L

S: Sim; N: Não

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos parecem indicar que a contaminação de sucos de maçã por patulina no Brasil é baixa. Entretanto, como os levantamentos realizados ainda são poucos e existe a possibilidade de variações devido à matéria prima utilizada, a real dimensão do problema somente será conhecida após monitoramento por um período maior de tempo e com a participação de outros grupos de pesquisa de outros estados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Saúde e CNPq pelo auxílio financeiro.

Prado, G. et al. Occurrence of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):21-25, 2000

**ABSTRACT.** Patulin is a mycotoxin produced by several species of moulds (*Penicillium*, *Aspergillus* and *Bissochlamys*), but mainly by the apple-rotting fungus *Penicillium expansum*. Patulin is a highly toxic compound that has been shown to be mutagenic, carcinogenic and teratogenic in experiments with animals. The patulin content of apple juice is a good indicator of the quality of the apples used in the process. Thirteen brands were collected from retail markets in the city of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil, between March and September 1999. A rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin was used. Patulin was extracted with ethyl acetate and the extract was cleaned up by partition with sodium carbonate solution. The identification and quantification of patulin was determined by C<sub>18</sub> reversed phase column (3 µm) and a variable-wavelength UV-VIS detector set at 278 nm. Patulin and 5-hydroxymethylfurfural were completely resolved by using 0,8% tetrahydrofuran in water containing 0,02% sodium azide as the mobile phase at a flow rate of 0,5 mL/min. The detection limit was < 5 µg/L. Average recoveries greater than 73% of patulin and coefficients of variation of less than 7% were obtained. Patulin was detected in only one sample (10 µg/L). Although the incidence of patulin in apple juice in the present study was low, Brazilian health authorities should continue monitoring these products.

**KEY WORDS.** Apple; apple juice; patulin; HPLC.

## REFERÊNCIAS

- Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup> ed. Virginia: Arlington; v. 2, cap. 49, p. 41-43.
- Bartolomé, B. et al. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **J. Chromatogr. A.**, 664: 39-43, 1994.
- Brackett, R.E. e Marth, E.H. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions apple juice. **J. Food Prot.**, 42 (11): 864-866, 1979.
- Brause, A.R. et al. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. **J. Assoc. of Anal. Chem. Int.**, 79 (2): 451-455, 1996.
- Burda, K. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. **J. Food Prot.**, 55 (10): 796-798, 1992.
- Burroughs, L.F. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, 60 (1): 100-103, 1977.
- Ceigler, A.; Beckwith, A.C.; Jackson, L.K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **App. Environ. Microbiol.**, 31: 664-667, 1976.
- Dickens, F.; Jones, H.E.H. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. **Br. J. Cancer**, 15: 85-100, 1961.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Worldwide regulations for mycotoxins. 1995.** Rome: A Compendium; 1996, n. 64, 45 p.
- Frémy, J.M. et al. Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. **Food Addit. Contam.**, 12 (3): 331-336, 1995.
- Gimeno, A.; Martins, M.L. Rapid thin chromatographic determination of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, 66 (1): 85-91, 1983.
- Gokmen, V.; Acar, J. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. **J. Chromatogr. A.**, 730: 53-58, 1996.
- Gokmen, V.; Acar, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **J. Chromatogr. A.**, 815: 99-102, 1998.
- Herry, M.P.; Lemétayer, N. Liquid chromatographic determination of patulin in French apple ciders. **J. Assoc. of Anal. Chem. Int.**, 79 (5): 1107-1110, 1996.
- Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, 63: 1344-1354, 1980.
- Jacquet, J.; Lafont, J.; Vilette, O. Sur la contamination des pommes et dérivés par la patuline. **Microb. Alim. Nutr.**, 1: 127-131, 1983.
- Le Bourhis, B. La patuline, un contaminant du jus de pomme. **Méd. et Nut.**, 20 (1): 23-30, 1984.
- Lindroth, S. Occurrence, formation and detoxification of patulin mycotoxin. **Publ. - Tech. Res. Cent. Finl. Mater. Proc. Techn.**, 24: 46 p., 1980.
- Manchisky Jr., M.; Midio, A.F. Incidência de patulina em jugo de manzana industrializado. **Alimentaria**, 33: 61-64, 1996.
- Northolt, M.D.; Van Egmond, H.P.; Paulsch, W.E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **J. Food Prot.**, 41 (11): 885-890, 1978.
- Ough, C.S.; Corison, C.A. Measurement of patulin in grapes and wines. **J. Food Sci.**, 45: 476-478, 1980.
- Prieta, J. et al. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. **J. Agric. Food Chem.**, 42 (8): 1701-1703, 1994.
- Stott, W.T.; Bullerman, L.B. Patulin: A mycotoxin of potential concern in foods. **J. Milk Food Technol.**, 38 (11): 695-705, 1975.
- Sydenham, E.W. et al. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Addit. Contam.**, 14 (5): 429-434, 1997.
- Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 16 (2): 71-74, 1999.
- Taniwaki, M.H. et al. Migration of patulin in apples. **J. Food Prot.**, 55 (11): 902-904, 1992.
- Trucksess, M.W.; Tang, Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered. **J. Assoc. of Anal. Chem. Int.**, 82 (5): 1109-1113, 1999.
- Watkins, K.L.; Fazekas, G.; Palmer, M.V. Patulin in Australian apple juice. **Food Australia**, 42 (9): 438-439, 1990.

Recebido em 09/11/1999; Aprovado em 04/09/2000

## Avaliação da alimentação de pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba, Estado do Amazonas

Feeding evaluation of pre-school children from Barcelos and Ajuricaba, Amazon State

Lucia K. O. YUYAMA <sup>1\*</sup>  
Jaime P. L. AGUIAR <sup>1</sup>  
Sonja H. M. MACEDO <sup>1</sup>  
Fernando H. ALENCAR <sup>1</sup>  
Dionisia NAGAHAMA <sup>1</sup>  
Déborah I. T. FÁVARO <sup>2</sup>  
Claudia AFONSO <sup>2</sup>  
Marina B. VASCONCELLOS <sup>2</sup>  
Sílvia M. F. COZZOLINO <sup>3</sup>

RIALA6/879

Yuyama, L.K.O. et al. Avaliação da alimentação de pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba, Estado do Amazonas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):27-32, 2000

**RESUMO.** Considerando a escassez de informações em relação às condições de saúde e nutrição dos pré-escolares da Calha do Rio Negro, avaliou-se 109 dietas de pré-escolares de Barcelos e 06 da área indígena de Ajuricaba-AM, por meio da análise química e percentual de adequação em relação aos valores recomendados pelo National Academy of Sciences/National Research Council (NAS/NRC). Verificou-se que os alimentos frequentemente consumidos foram: farinha de mandioca, pão, peixe, arroz, bolacha doce, feijão, café, banana e outros, com uma frequência inferior a 10%. As dietas analisadas apresentaram uma adequação energética média de 21,5% e 10%, proteína de 57,9% e 76% para as dietas dos pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba respectivamente.

Os elementos minerais Ca, Zn e K apresentaram uma adequação inferior a 40%; ferro próximo a 40% e valores superiores a 100% para Na e Mo na dieta de Barcelos. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o consumo de frutas e verduras não faz parte do hábito alimentar dos pré-escolares ribeirinhos, o aporte energético é limitante, seguido do cálcio, zinco e ferro e a dieta não atende às recomendações preconizadas para a maioria dos nutrientes estudados.

**PALAVRAS-CHAVE.** Avaliação de dietas; pré-escolares; alimentação; minerais.

<sup>1</sup> Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos da Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde/INPA.

<sup>2</sup> Instituição de Pesquisas Energéticas e Nucleares-Comissão Nacional de Energia Nuclear-IPEN/CNEN.

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

\* Endereço para correspondência: Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos da Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde/INPA. CP 478, Manaus – AM. CEP 69083-970. E-Mail: yuyama@inpa.gov.br.



## INTRODUÇÃO

As deficiências nutricionais ocorrem em todo o mundo, atingindo principalmente os países em desenvolvimento e regiões onde a fome e a alimentação inadequada imperam com frequência. Por sua vez, a avaliação dietética é um dos parâmetros importantes para se traçar o perfil nutricional de um grupo populacional, pois por meio desses estudos, pode-se obter a identificação de grupos de alto risco e monitoramento de programas apropriados de intervenção nutricional<sup>15</sup>.

No Brasil, as informações sobre consumo alimentar da população, indicador de grande importância para o conhecimento da cadeia causal da desnutrição, são escassas e a melhor fonte de dados baseia-se, principalmente, em alguns inquéritos de abrangência nacional, realizados pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística entre 1974-75<sup>12</sup>, 1987-88<sup>13</sup> e 1995-1996<sup>14</sup>. Mais recentemente, por meio de um estudo multicêntrico, levantou-se o consumo alimentar em 6 cidades brasileiras, demonstrando que as famílias com renda de até dois salários mínimos nos Municípios de Campinas, Ouro Preto, Rio de Janeiro e Goiânia apresentaram risco nutricional de macro e micro nutrientes com ênfase para cálcio, ferro, retinol e vitamina B<sub>2</sub>, e índices de inadequação de 20 até 70%<sup>20</sup>. Outros estudos demonstram que a alimentação é inadequada em cálcio<sup>11,22,24,30</sup>, zinco<sup>11,19,21,31</sup>, ferro<sup>9,21,22,30</sup> e selênio<sup>7,11</sup>, exceto para a região de Manaus<sup>11,32</sup> e Santa Catarina II<sup>11</sup>, cujas concentrações de selênio superam as recomendações da NAS/NRC<sup>25</sup>.

Entretanto, quando se fala na avaliação de macro e microelementos minerais, a avaliação dietética por meio de inquéritos e tabelas de composição de alimentos torna-se pouco satisfatória, pois sabe-se que a informação obtida por este método não proporciona dados reais sobre o consumo destes nutrientes, sendo, portanto, recomendada a análise química laboratorial da porção em duplicata da dieta consumida<sup>1</sup>.

No Amazonas, há uma grande lacuna de informações, em especial da alimentação dos pré-escolares da área rural de Manaus, dada a dificuldade de acesso e apoio logístico, bem como sua diversidade regional com características específicas de cada um dos Ecossistemas Amazônicos. Dessa forma, a presente proposta teve como objetivo avaliar quali e quantitativamente a dieta dos pré-escolares do Município de Barcelos e Ajuricaba – Estado do Amazonas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em Barcelos, maior Município do Estado do Amazonas, com uma área de 89.572 km<sup>2</sup> e uma população de 10.856 habitantes, o que configura uma densidade demográfica de 0,12 hab./km<sup>2</sup>. Situa-se na margem direita do Rio Negro, afluente do Rio Amazonas, a 40 m acima do nível do mar, distando da capital do Estado 396 km em linha reta e 496 km por via fluvial. Localiza-se ao Norte do Estado do Amazonas, limitando-se com os Municípios de Novo Airão, Codajás, Moura, Santa Isabel do Rio Negro, com o Estado de Rorai-

ma e República da Venezuela a 0°58'01" de Latitude Sul e 62°56'00" de longitude a Oeste de Greenwich<sup>26</sup>.

De um universo de 312 pré-escolares estudados do Município de Barcelos-AM, envolvendo a área urbana e rural, coletou-se de uma sub-amostra de dietas de 109 crianças, por meio da porção em duplicata de um dia, incluindo todas as refeições inclusive os líquidos consumidos e 06 dietas da área indígena de Ajuricaba-AM. As dietas foram congeladas em freezer a -15°C e transportadas até o Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, onde procedeu-se a secagem em estufa com circulação de ar forçada a 60°C até peso constante a fim de determinação da umidade. Em seguida, as dietas secas foram pulverizadas e analisadas quimicamente, com quantidades específicas para cada análise, conforme descrição nos diferentes métodos utilizados<sup>4,5,33</sup>.

Uma alíquota da dieta foi encaminhada à Supervisão de Radioquímica do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN-CNEN), para a determinação dos teores de elementos minerais pela técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental, descrito no trabalho de Yuyama et al.<sup>33</sup>.

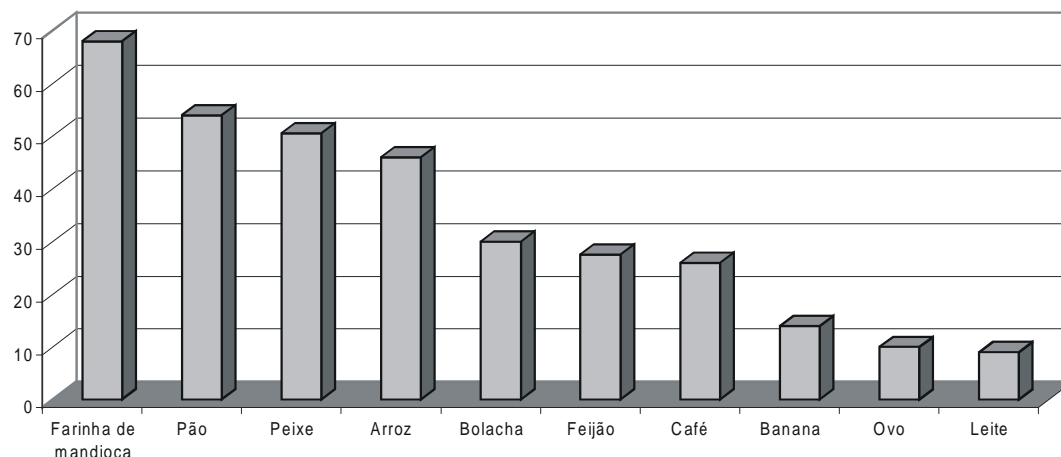
As demais análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. A determinação da composição centesimal em triplicata seguiu as recomendações da AOAC<sup>5</sup>, a fração fibra (solúvel e insolúvel) o método enzimico-gravimétrico de Asp et al.<sup>4</sup>, e o percentual de adequação tomando-se como referencial crianças na faixa etária de 4 a 6 anos, de acordo com as recomendações da NAS/NRC<sup>25</sup>. O valor energético da dieta foi calculado a partir dos teores da fração protéica, lipídica e nifext, utilizando-se os coeficientes específicos que levam em consideração o calor de combustão 4,0; 9,0 e 4,0 kcal respectivamente.

## RESULTADOS

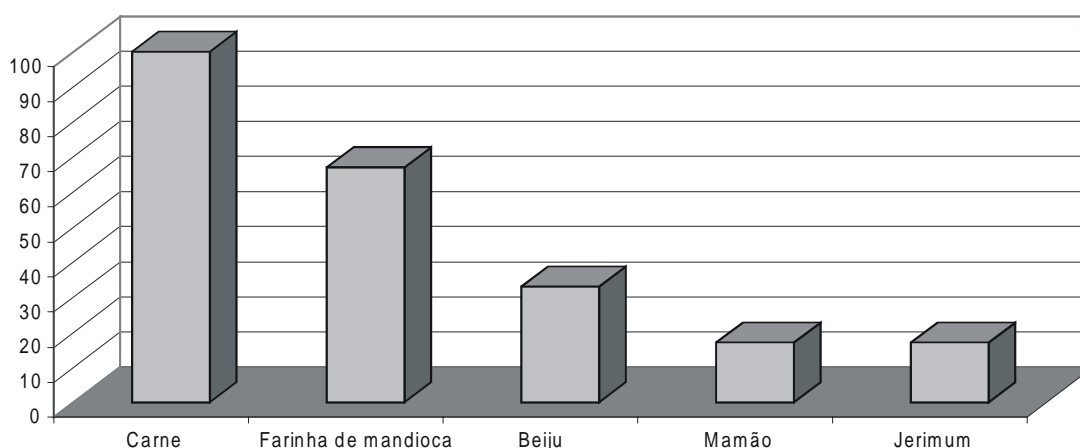
Uma característica importante da dieta analisada foi o alto consumo de farinha de mandioca, hábito típico da população amazonense, em especial do interior, com uma frequência de 68,0%, seguido do pão (54,0%), peixe (50,5%), arroz (46,0%), bolacha (30%), feijão (27,5%), café (26%), banana (14,0%), ovo (10%) e leite (9,0%) (Figura 1), enquanto que a dieta da área indígena apresentou maior frequência no consumo de carne de caça (100%) e de farinha de mandioca (66,6%), seguido de beiju (33,3%), mamão e jerimum (6,6%) (Figura 2).

Quanto à composição centesimal das dietas analisadas, observou-se um maior teor de proteína e fibra alimentar total na alimentação consumida pelos pré-escolares de Ajuricaba-AM. (Tabela 1).

O consumo “per capita” diário de nutrientes, adequação protéica, energética e mineral de Barcelos e Ajuricaba-AM, encontram-se na Tabela 2.



**Figura 1.** Frequência de consumo de alimentos da dieta dos pré-escolares de Barcelos-AM



**Figura 2.** Frequência de consumo de alimentos da dieta dos pré-escolares da área indígena de Ajuricaba-AM

**Tabela 1.** Composição centesimal e energia da dieta<sup>1</sup> de pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba-AM

Constituintes	Valores médios	
	Barcelos	Ajuricaba
Umidade (%)	69,7	50,3
Nifext (%)*	21,6	19,0
Proteína (%)	4,5	21,8
Lipídio (%)	2,3	5,8
Cinza (%)	1,0	1,4
Fibra insolúvel (g)	0,6	1,7
Fibra solúvel (g)	0,2	0,1
Fibra total (g)	0,8	1,8
Energia (kcal/100g)	125,1	215,4

\* Calculado por diferença

<sup>1</sup> Base úmida

**Tabela 2.** Percentagem de adequação de proteínas, calorias e minerais da dieta dos pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba-AM

Nutrientes	Consumo per capita		RDA*	% de adequação	
	Barcelos	Ajuricaba		Barcelos	Ajuricaba
Proteína (g)	13,9	18,2	24	57,9	76,0
Calorias	387,2	180,2	1800	21,5	10,0
Na (mg)	663,6±39,4	190,4±14,3	300	221,2	63,5
K (mg)	418,5±73,9	262,0±13,1	1400	29,9	18,7
Ca (mg)	96,2±27,3	13,5±1,7	800	12,0	1,7
Mg (mg)	50,9±5,6	20,2±0,4	120	42,4	16,8
Se (µg)	15,6±1,8	7,6±0,2	20	78,0	38,0
Fe (mg)	4,0±0,6	3,5±0,5	10	40,0	35,0
Mn (µg)	670,5±51,5	108,1±24,9	1500-2000	44,7-33,5	7,2-5,4
Zn (mg)	1,6±0,1	3,8±0,4	10	16,0	38,0
Br (µg)	938,8±18,8	212,1±4,2			
Mo (µg)	48,8±15,9	24,5±0,4	30-75	162,7-65,1	81,7-32,7
Cl (mg)	1000±100	300±100	500	200,0	60,0

\* NAS/NRC<sup>25</sup>

Consumo médio: Dieta de Barcelos 309,55g/dia; Ajuricaba 83,68g/dia (resultados em peso úmido)

## DISCUSSÃO

A quantidade de fibra total encontrada na dieta da população indígena de Ajuricaba (1,8 g/100 g) foi maior que na dieta de Barcelos, sendo que em relação à fração solúvel ambas apresentaram apenas traços (Tabela 1), refletindo dessa forma, o baixo consumo de alimentos ricos em fibra como frutas e verduras, conforme demonstrado na composição da dieta (Figura 1).

Confrontando os resultados do presente estudo com os da literatura regional, percebe-se que o panorama nutricional tem se mantido praticamente inalterado nas últimas décadas, principalmente nas comunidades ribeirinhas e localidades do interior. Esta realidade alimentar é marcada pelo baixo consumo de frutas e hortaliças. Shrimpton e Giugliano<sup>28</sup>, desde a década de 70, já enfatizaram a monotonia alimentar e a prevalência do alto consumo de peixe, pão e farinha como sendo características marcantes da dieta do amazonense.

Esses resultados refletem a forte influência do fator cultural arraigado na população amazônica em não consumir verduras conforme já mencionado em trabalhos anteriores<sup>9,16,17,27,28</sup>, apesar da existência de frutos, com quantidades consideráveis de fibra alimentar<sup>2</sup>, elementos minerais<sup>33</sup> e vitaminas<sup>3</sup>.

A adequação protéica das dietas analisadas foi inferior a 80%, índice inferior àquelas habitualmente registradas por outros estudos, cujo aporte protéico esteve acima do recomendado<sup>9,27</sup>. Entretanto, resultados semelhantes foram verificados por Vasquez<sup>30</sup> em crianças com idade compreendida entre 1 a 3 anos, apesar de serem oriundas de uma creche de Manaus. Ainda assim, os ribeirinhos mantêm o hábito tradicional em relação ao consumo de peixes, dependendo da safra e do local estudado.

A adequação energética foi baixa (21,5 e 10 %) para as dietas dos pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba, respectivamente, muito aquém dos valores encontrados em outros estudos da região<sup>9,23</sup>. A deficiência de energia na alimentação representa um grave problema nutricional, visto que se a ingestão calórica não satisfaz as necessidades, torna-se muito difícil manter o aproveitamento adequado dos demais nutrientes essenciais. Concorrendo com esta situação, a proteína, que também se encontrou deficitária, provavelmente teria a sua utilização plástica desviada para o suprimento das necessidades energéticas, como forma de minimizar o gasto energético, podendo contribuir para o agravamento do quadro da desnutrição energético-protéica. Obviamente, há necessidade de estudos específicos no que se refere ao aporte energético, objetivando a minimização da desnutrição energético-protéica, uma das deficiências nutricionais de maior abrangência epidemiológica<sup>6,18</sup>.

A adequação de consumo de sódio e molibdênio da dieta de Barcelos apresentou-se superior a 100%, contrapondo-se com a baixa adequação desses elementos na dieta de Ajuricaba (Tabela 2). Considerando que o molibdênio participa de várias

reações enzimáticas vitais ao organismo, tais como na síntese de proteína e ácidos nucleicos<sup>29</sup>, salienta-se a relevância do registro da composição do mesmo nas dietas estudadas.

Em relação ao sódio, o valor encontrado foi semelhante aos de outros estudos<sup>11,22,24,30</sup>. Geralmente a ingestão deste mineral ultrapassa em muito as recomendações nutricionais, variando entre 1,75 g a 15,6 g<sup>8</sup>. Em dietas regionais brasileiras analisadas quimicamente, os valores encontrados situam-se entre 3,5 a 7,8 g<sup>11</sup>.

Os demais elementos minerais presentes nas dietas dos pré-escolares de Barcelos e Ajuricaba apresentaram adequação inferior a 50% (Tabela 2). Tais limitações foram observadas em alguns estudos realizados em algumas áreas da região Amazônica<sup>16,22,27,30,31,32</sup> bem como em diferentes regiões e grupos etários do Brasil, onde a alimentação também é inadequada em cálcio<sup>11,33</sup>, zinco<sup>19</sup>, ferro<sup>11</sup>. A dieta dos pré-escolares de Barcelos-AM apresentou uma adequação de selênio de aproximadamente 80%, demonstrando que de uma certa forma, o solo pode conter quantidades consideráveis deste elemento. Yuyama e Cozzolino<sup>11,32</sup> encontraram resultados superiores à recomendação para o selênio em dieta de Manaus. Concentrações elevadas também foram encontradas na dieta de Mato Grosso<sup>7,11</sup>.

Apesar do número inexpressivo de dietas da área indígena de Ajuricaba, os resultados apresentados têm a sua importância epidemiológica considerando-se o vazio demográfico da Amazônia, notadamente na área indígena, bem como a monotonia de cardápios constatado na maloca estudada.

Numa revisão sobre a dieta e estado nutricional de ameríndios, habitantes de distintas regiões das florestas tropicais da Amazônia, verificou-se que a macaxeira (*Manihot esculenta*), em forma de beiju, goma ou farinha; peixe; alguns frutos de palmáceas ou bananas; animais silvestres e invertebrados, faziam parte do hábito alimentar da maioria dos grupos, diferenciando em alguns frutos ou vegetais como o palmito, arroz e castanhas<sup>10</sup>.

Diferentemente do presente estudo, o aporte energético e protéico de alguns grupos indígenas adultos registrados, na referida revisão, foi superior a 100% do recomendado, sendo extensivo aos minerais: cálcio, fósforo, ferro e vitaminas como o ácido ascórbico, tiamina, ribloflavina e niacina. É necessário enfatizar que estes resultados foram obtidos pelo método da análise direta dos alimentos.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que na dieta dos pré-escolares de Barcelos-AM e área indígena de Ajuricaba-AM, os alimentos freqüentemente consumidos foram a farinha de mandioca, pão, arroz e peixe, destacando-se o baixo consumo de frutas e verduras. A dieta consumida apresentou um déficit energético e protéico demonstrando o risco de acometimento de desnutrição energético-protéica a que o grupo estudado está submetido.

O sódio e molibdênio foram os elementos minerais com maior percentual de adequação na dieta de Barcelos-AM, ao passo que o ferro e o cálcio apresentaram baixa adequação em ambas localidades estudadas, seguido do zinco. Vale ressaltar que a baixa adequação no que se refere aos elementos minerais é preocupante, por se tratarem de nutrientes importantes ao

crescimento e desenvolvimento do organismo, atingindo diretamente o grupo estudado. Dessa forma, sugere-se um melhor aproveitamento de certas frutas típicas da Amazônia, que podem contribuir na melhoria do hábito alimentar e consequentemente no estado nutricional, assim como programas que possam nortear a melhoria das condições de saúde e nutrição.

RIALA6/879

Yuyama, L.K.O. et al. Feeding evaluation of pre-school children from Barcelos and Ajuricaba, Amazon State. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):27-32, 2000

**ABSTRACT.** Considering the scanty information about health and nutrition conditions of the pre-school in Calha do Rio Negro, 109 diets from the Barcelos region and 06 diets from the indigenous area of Ajuricaba-AM, were evaluated by means of chemical analysis and adequacy percentage related to the recommended intakes set by National Academy of Sciences/National Research Council (NAS/NRC) for children (4-6 years old). The duplicate portion technique was used for sampling the diets. It was verified that the foods more frequently consumed were: cassava flour, bread, fish, rice, crackers, beans, coffee, banana. Others had a frequency below 10%. The diets analyzed showed an energy deficit of 21,5% and 10% and a proteic deficit of 57,9% and 76%, for Barcelos and Ajuricaba regions, respectively. According to the results obtained, it can be concluded that the consumption of greens is not part of the feeding habits of rural Amazon population, and the caloric contribution content of the available food is very low. Considering the mineral elements Ca, Fe, Mg, Se, and Zn, we were able to verify that both diets analyzed in the present work have not reached the values recommended by NAS/NRC. With regard to Na and Mo, the diet in Barcelos exceeded the values recommended.

**KEY WORDS.** Feeding evaluation; pre-school children; feeding; mineral.

## REFERÊNCIAS

1. Abdulla, M. et al. Assessment of food consumption. **Scand. J. Gastroenterology**, 14(52):28-41, 1979.
2. Aguiar, J.P.L. Tabela de composição dos alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, 26(1/2):121-26, 1996.
3. Aguiar, J.P.L. et al. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, 10(4):755-58, 1980.
4. ASP, N.G. et al. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **J. Agric. Food Chem.**, 31: 476-82, 1983.
5. Association Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17<sup>th</sup> ed., Arlington, AOAC., 1995. 1141 p.
6. Batista Filho, M.; Rissin, A. Deficiências nutricionais: Ações específicas do setor Saúde para o seu controle. **Cad. Saúde Públ.**, 9(2):130-135, 1993.
7. Boaventura, G.T. **Avaliação nutricional relativa ao selênio de estudantes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**. São Paulo, 1994. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
8. Carraza, F.R. Minerais em dietas latino-americanas. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, 38(3):599-621, 1988.
9. Duarte, M.R.B. **Estudo dos fatores de risco nutricional em crianças matriculadas em pré-escolas das redes de ensino particular, estadual e municipal da cidade de Manaus (AM) em 1987. Avaliação dos inquéritos alimentar, sócio-econômico e cultural**. Manaus, 1989. [Dissertação de Mestrado, INPA/FUA].
10. Dufour, D.L. Diet and nutritional status of Ameridians: a review of the literature. **Cad. de Saúde Públ.**, 7(4):481-502, 1991.
11. Favaro, D.I.T. et al. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. **J. Trace Elements. Med. Biol.**, 11: 129-36, 1997.
12. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – FIBGE. **Estudo nacional da despesa familiar**. ENDEF. Publicações Especiais, Rio de Janeiro, 1977.
13. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – FIBGE. **Pesquisas de Orçamentos Familiares, 1987-1988**. No.1 e 2, Rio de Janeiro, 1988.
14. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – FIBGE. **Pesquisas de Orçamentos Familiares, 1995-1996**. N° 2. Consumo Alimentar Domiciliar Per Capita, Regiões Metropolitanas, Brasília – DF, Municípios de Goiânia, Rio de Janeiro, 1998.
15. Galisa, M.S.; Biscolla, M.O.M.; Moreira, V.. Análise da eficiência de um programa de educação nutricional. **O Mundo da Saúde**, 20(7): 230-232, 1996.
16. Giugliano, R.; Giugliano, L.G.; Shrimpton, R. Estudos nutricionais da populações rurais da Amazônia. I. Várzea do rio Solimões. **Acta Amazonica**, 11(4):773-788, 1981.
17. Giugliano, R. et al. Estudos nutricionais das populações rurais da Amazônia. II. Rio Negro. **Acta Amazonica**, 14(3-4):427-449, 1984.
18. Hartman, A.F.; João, W.S.J. Desnutrição protéico-calórica na região Centro-amazônica: relatório preliminar da prevalência e fatores demográficos. **J. Ped.**, 45 (5):323-332, 1978.
19. Horner, M.R. et al. Inquérito dietético com base no consumo familiar: O caso de Ilhéus, Bahia, Brasil, em 1979. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 31(4):726-39, 1981.

20. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação / Universidade Estadual de Campinas. **Estudo Multicêntrico sobre consumo de alimentos. Relatório Final.** INAN/MS. Campinas, 1997. 83 p.
21. Lehti, K.K. Iron, folic acid and zinc intakes and status of low socio-economic pregnant and lactating amazonian women. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 43:505-13, 1989.
22. Nagahama, D. **Estudo comparativo da composição química das 20 dietas representativas da ingestão dietética de mulheres em idade fértil de um bairro pobre de Manaus-AM.** Manaus, 1994. [Dissertação de Mestrado – INPA/FUA].
23. Nagahama, D. et al. Avaliação nutricional e alimentar de pré-escolares de uma creche de Manaus e a influência da entidade no estado nutricional de sua população. **Acta Amazônica**, 20:119-29, 1990.
24. Nagahama, D. et al. Composição química e percentual de adequação da alimentação dos servidores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM. In: **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Rio de Janeiro, 1998. p.601-604.
25. National Academy of Sciences/National Research Council. **Recommended dietary allowances.** 10<sup>th</sup> ed. Washington, 1989. 284p.
26. Sebrae/AM. Diagnóstico sócioeconômico e cadastro empresarial de Barcelos. Manaus: Departamento de estudo e Pesquisa, 1994. 199p
27. Shrimpton, R. Food consumption and dietary adequacy according to income in 1200 families, animals, Amazonas, Brazil, 1973-74. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 34 (4):615-29, 1984.
28. Shrimpton, R.; Glugliano, R. Consumo de alimentos e alguns nutrientes em Manaus, Amazonas. 1973-4. **Acta Amazonica**, 9 (1):117-141, 1979.
29. Underwood, E. J. **Trace elements in human and animal nutrition.** 4th ed., New York: Academic Press, 1977. 545p.
30. Vasquez, A.L.V. **Biodisponibilidade de zinco da dieta dos pré-escolares de uma creche de Manaus, AM. Efeito da adição da farinha de banana (Musa paradisiaca) em ratos.** Manaus, 1998. [Dissertação de Mestrado, Universidade do Amazonas – AM].
31. Yuyama, L.K.O.; Rocha, Y.R.; Cozzolino, S.M.F. Composição química e percentual de adequação da dieta regional de Manaus, AM. **Acta Amazônica**, 22 (4):587-593, 1992.
32. Yuyama, L.K.O.; Cozzolino, S.M.F. Determinação dos teores de Zn, Fe, Ca, Se, Cu, K e Mn na dieta regional de Manaus-AM. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 55 (1): 45-50, 1995.
33. Yuyama, L.K.O. et al. Determinação dos teores de elementos minerais em alimentos convencionais e não convencionais da região Amazônica pela técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental. **Acta Amazônica**, 27 (3):183-96, 1997.
34. Wilson, D. et al. Nutritional status of children inmates of a small Institution for homeless children in the capital of the state of São Paulo, Brazil. **Rev. de Saúde Pública**, 4:300-309, 1980.

Recebido em 29/02/2000; Aprovado em 04/09/2000

## ***Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 - 1999**

*Salmonella*: serotypes identified in the São José do Rio Preto area, SP, during the period of 1990 - 1999

Ivete A. Z. C. de ALMEIDA<sup>1</sup>  
Jacqueline T. M. PERESI\*  
Inara S. de CARVALHO<sup>1</sup>  
Elisabete C. A. RODRIGUES<sup>1</sup>  
Denise F. MARQUES<sup>1</sup>  
Ana T. TAVECHIO<sup>2</sup>  
Sueli A. FERNANDES<sup>2</sup>

RIALA6/880

Almeida, I.A.Z.C. et al. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 – 1999. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 33-37, 2000

**RESUMO.** No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999, no Instituto Adolfo Lutz – Lab. I de São José do Rio Preto–SP, foram isoladas 324 cepas de *Salmonella*, sendo 155 de infecções humanas e 169 de alimentos destinados ao consumo humano. Dos 17 diferentes sorotipos identificados a partir de infecções humanas, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo *enteritidis* (*S. enteritidis*) foi o predominante (75,0%). O material fecal representou a principal fonte de isolamento das cepas, principalmente pela ocorrência dos vários surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA). A partir dos alimentos, 26,6% deles envolvidos em surtos de DVA, foram identificados 30 diferentes sorotipos, também com a predominância de *S. enteritidis* (56,2%). Os alimentos apresentando maior número de isolamentos de cepas de *Salmonella* foram a carne e seus derivados (59,7%), seguidos por ovos e seus derivados (16,0%), nos quais, *S. enteritidis* foi o sorotipo mais prevalente (57,4% e 81,5%, respectivamente). Estes resultados demonstram que *S. enteritidis* permanece o sorotipo mais freqüentemente isolado, tanto em infecções humanas quanto em alimentos. Os alimentos mais comumente implicados em DVA ainda são as carnes de aves e ovos, bem como os seus derivados, quando consumidos crus ou mal cozidos.

**PALAVRAS-CHAVE.** *Salmonella*; sorotipos; *Salmonella* em alimentos; *Salmonella* em materiais clínicos.

### **INTRODUÇÃO**

O gênero *Salmonella* tem sido de importância para a saúde pública, considerando-se seu caráter zoonótico e sua

ampla distribuição na natureza. Entre os 2.435 sorotipos de *Salmonella* existentes<sup>18</sup>, a maioria, classificada como ubiqüitária, tem sido responsável principalmente por surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA), em vários

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz – Lab. I de São José do Rio Preto

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz – Lab. Central – São Paulo

\* Endereço para correspondência: Rua Alberto Sufredini, 2325 – São José do Rio Preto – SP – CEP 15.060-020  
Tel. (017) 224-2602

países do mundo, incluindo o Brasil<sup>1,3,4,5,6,11,13,14,17,19,20</sup>.

A produção industrial de alimentos de origem animal e o intercâmbio comercial intensivo de animais e produtos derivados destinados ao consumo humano têm favorecido a introdução e disseminação de novos sorotipos de *Salmonella* na cadeia alimentar<sup>2</sup>. Alguns estão associados com determinadas fontes de contaminação, e são isolados com maior frequência em uma área geográfica específica. Outros, podem ser frequentemente isolados em diferentes países, a exemplo de *S. typhimurium* e *S. enteritidis*<sup>10</sup>.

No Estado de São Paulo, de acordo com Taunay et al.<sup>21</sup>, foram observadas alterações na frequência dos sorotipos de *Salmonella*, isolados de amostras de infecções humanas e de materiais de origem não-humana, no período de 1950-1990. Em estudo realizado posteriormente, foi verificada também no nosso meio variação na prevalência dos sorotipos de *Salmonella*, com um aumento significativo no isolamento de *S. enteritidis*<sup>22</sup>. A partir de 1993, *S. enteritidis* tem representado o sorotipo predominante e responsável pelo grande número de surtos de DVA, sendo incriminados, principalmente, os alimentos preparados à base de ovos crus ou insuficientemente cozidos<sup>1,11,14,17</sup>.

A sorotipagem de cepas de *Salmonella* é considerada uma etapa inicial de grande importância no rastreamento epidemiológico de uma fonte de infecção. A associação entre sorotipos isolados de materiais de origem humana e não-humana permite direcionar a ação de órgãos competentes no que se refere ao controle do agravo.

Este estudo visa avaliar a distribuição anual e frequência dos sorotipos de *Salmonella* isolados de infecções humanas e de alimentos, no período de 1990-1999, no Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de São José do Rio Preto-SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999, no Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de São José do Rio Preto, foram isoladas 324 cepas de *Salmonella*, sendo 155 de casos de infecções humanas e 169 de alimentos destinados ao consumo humano.

O isolamento de *Salmonella* a partir de materiais clínicos (sangue, fezes e líquido) foi realizado segundo Ewing<sup>8</sup> e Pessoa et al<sup>15</sup>.

Para a análise de alimentos, foi utilizada a metodologia recomendada por Flowers et al.<sup>9</sup> com modificações pertinentes relacionadas à substituição do caldo de pré-enriquecimento por água peptonada 1% tamponada, do meio de identificação presuntiva pelo IAL<sup>16</sup> e introdução do meio de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e do meio de isolamento Brilliant-Green.

A caracterização dos sorotipos, baseada na determinação dos antígenos somáticos e flagelares, foi realizada de acordo com o esquema Kauffmann-White descrito por Popoff

e Le Minor<sup>18</sup>. Tanto a sorotipagem, como a produção de todos os antissoros, polivalentes e monovalentes, necessários para a diferenciação dos 2.435 sorotipos de *Salmonella* existentes até 1997, foram realizados no Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período estudado, foram identificados 36 diferentes sorotipos de *Salmonella* (Tabela 1). Observou-se que até o ano de 1992 foi isolada uma pequena variedade de sorotipos, não havendo predomínio evidente de nenhum deles. Entretanto, nos anos seguintes nota-se o aumento no isolamento de *S. enteritidis*. Ainda, na Tabela 1, observa-se o isolamento de alguns sorotipos apenas em um determinado período, como *S. berta* em 1991, *S. dublin* em 1992 e *S. heidelberg* em 1996.

Em relação às cepas de *Salmonella* isoladas de origem humana, foram caracterizados 17 sorotipos, cuja principal fonte de isolamento foi material fecal (Tabela 2). Verificou-se, também, que *S. enteritidis* representou o sorotipo mais frequentemente isolado a partir de 1993, sendo que a maioria destas cepas estava associada a surtos de DVA. Kaku et al.<sup>12</sup> em 1993 relataram o primeiro surto de DVA por *S. enteritidis* no Estado de São Paulo, o qual ocorreu na região de São José do Rio Preto. Desde então, tem sido frequente a ocorrência de surtos com número significativo de afetados e hospitalizados nesta região.

O aumento progressivo no isolamento de *S. enteritidis*, desde 1994, tem sido observado, também, em outras regiões do Estado de São Paulo<sup>1,7,11,14,17,22</sup>.

No que se refere às cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos, foram identificados 30 diferentes sorotipos (Tabela 3). Apesar da diversidade de sorotipos observada, a *S. enteritidis* também foi a mais frequente (56,2%), principalmente, a partir de 1994.

Nas diversas classes de alimentos analisados (Tabela 3), a presença de salmonela foi predominante nas carnes e derivados (59,7%), sendo 90,0% de origem aviária, e nos ovos e derivados (16,0%). Verificou-se, também, maior variedade de sorotipos em carnes e especiarias, sendo que a *S. oranienburg* foi detectada apenas em especiarias e temperos e que as carnes e derivados constituíram importantes fontes de isolamento de *S. albany* e *S. agona*.

Os resultados também demonstraram a grande contaminação de ovos e carnes e derivados por *S. enteritidis*. É importante salientar que 26,6% dos alimentos analisados estavam associados com surtos de DVA. A evidência da importância de *S. enteritidis* em infecções humanas e nos alimentos, principalmente os de origem animal, permite suspeitar do risco que estes representam à Saúde Pública, se consumidos inadequadamente preparados.

**Tabela 1.** Frequência anual dos sorotipos de *Salmonella* identificados em materiais de origem humana e alimentos, no período de 1990 – 1999, na região de São José do Rio Preto

Sorotipos	1990		1991		1992		1993		1994		1995		1996		1997		1998		1999		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	05	31,3	30	100,0	45	57,0	50	63,3	54	71,1	09	52,9	18	90,0	211	65,1
<i>S. infantis</i>	-	-	01	50,0	-	-	-	-	-	-	04	5,1	-	-	-	-	01	5,9	-	-	06	1,8
<i>S. agona</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07	8,9	02	2,5	-	-	-	-	-	-	09	2,8
<i>S. hadar</i>	-	-	-	-	01	25,0	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	02	0,6
<i>S. anatum</i>	-	-	-	-	-	-	01	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. typhimurium</i>	01	100,0	-	-	01	25,0	01	6,2	-	-	01	1,3	-	-	-	-	01	5,9	-	-	05	1,5
<i>S. ohio</i>	-	-	-	-	-	-	06	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	06	1,9
<i>S. oranienburg</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	03	3,9	02	11,8	-	-	05	1,5
<i>S. senftenberg</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. give</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. mbandaka</i>	-	-	-	-	-	-	03	18,8	-	-	03	3,8	06	7,6	-	-	-	-	-	-	12	3,7
<i>S. newport</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. javiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	2,5	01	1,3	-	-	02	10,0	05	1,5
<i>S. montevideo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. rubislaw</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. schwarzengrund</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04	5,1	-	-	01	1,3	-	-	-	-	05	1,5
<i>S. emek</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	13	17,1	-	-	-	-	14	4,3
<i>S. saphra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	01	5,9	-	-	02	0,6
<i>S. sandiego</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	02	2,5	01	1,3	-	-	-	-	04	1,2
<i>S. gloucester</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	03	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	03	0,9
<i>S. I 4,12:g,s,t:-</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. enterica</i> subsp <i>enterica</i> cepa rugosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	03	3,8	-	-	02	11,8	-	-	06	1,9
<i>S. ealing</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. albany</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	2,5	03	3,8	-	-	-	-	-	-	05	1,5
<i>S. arechavaleta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. livingstone</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. lexington</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. I 9,12:-:-</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. I 1,3,19:-:-</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	2,5	-	-	-	-	-	-	02	0,6
<i>S. belem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	5,9	-	-	01	0,3
<i>S. berta</i>	-	-	01	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. bredeney</i>	-	-	-	-	01	25,0	-	-	-	-	02	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	03	0,9
<i>S. dublin</i>	-	-	-	-	01	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. heidelberg</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<i>S. I 4,5,12:r:-</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	2,5	-	-	-	-	-	-	02	0,6
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,3	-	-	-	-	-	-	01	0,3
<b>TOTAL</b>	<b>01</b>	<b>0,3</b>	<b>02</b>	<b>0,6</b>	<b>04</b>	<b>1,2</b>	<b>16</b>	<b>4,9</b>	<b>30</b>	<b>9,3</b>	<b>79</b>	<b>24,4</b>	<b>79</b>	<b>24,4</b>	<b>76</b>	<b>23,5</b>	<b>17</b>	<b>5,2</b>	<b>20</b>	<b>6,2</b>	<b>324</b>	<b>100,0</b>



**Tabela 2.** Sorotipos de *Salmonella* isolados de materiais de origem humana, na região de São José do Rio Preto, no período de 1990 - 1999

Sorotipos	Sangue		Fezes		Líquor	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
S. enteritidis	-	-	116	76,3	-	-
S. agona	-	-	05	3,2	-	-
S. infantis	-	-	01	0,7	-	-
S. berta	-	-	01	0,7	-	-
S. bredeney	-	-	03	2,0	-	-
S. hadar	-	-	01	0,7	-	-
S. typhimurium	01	50,0	01	0,7	-	-
S. dublin	-	-	01	0,7	-	-
S. ohio	-	-	04	2,6	-	-
S. mbandaka	-	-	02	1,3	-	-
S. heidelberg	-	-	01	0,7	-	-
S. I 4,5,12:r:-	-	-	02	1,3	-	-
S. emek	-	-	10	6,5	-	-
S. schwarzengrund	-	-	-	-	01	100,0
S. typhi	01	50,0	-	-	-	-
S. sandiego	-	-	01	0,7	-	-
S. javiana	-	-	03	2,0	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>02</b>	<b>1,3</b>	<b>152</b>	<b>98,1</b>	<b>01</b>	<b>0,6</b>

A implantação de *S. enteritidis* no Estado de São Paulo parece estar relacionada ao comércio de matrizes de aves com países desenvolvidos. Também, o desenvolvimento industrial na região, nos últimos anos, particularmente de frigoríficos avícolas, pode ter favorecido a disseminação de *S. enteritidis* em nosso meio, através de alimentos contaminados, principalmente de origem aviária, responsáveis pelo grande número de surtos ocorridos<sup>14</sup>.

A identificação de sorotipos emergentes, bem como a detecção de suas origens e procedências, direciona medidas de controle que podem minimizar a ocorrência de bactérias nos alimentos, com conseqüente diminuição de DVA.

Este estudo, que representa parte do papel do Laboratório de Saúde Pública, oferece subsídios para o controle das salmoneloses, doença de âmbito mundial, cujas conseqüências refletem negativamente na economia do país.

**Tabela 3.** Sorotipos de *Salmonella* isolados por grupo de alimentos, na região de São José do Rio Preto, no período de 1990 - 1999

Sorotipos	carnes e derivados		peixados e derivados		pratos prontos		ovos e derivados		leite e derivados		produtos de confeitaria		especiarias		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
S. enteritidis	58	57,4	01	100,0	04	80,0	22	81,5	-	-	10	71,4	-	-	95	56,2
S. infantis	04	3,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	5,3	05	2,9
S. agona	04	3,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04	2,3	
S. hadar	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. anatum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	7,1	-	-	01	0,6
S. typhimurium	-	-	-	-	-	-	-	-	02	100,0	-	-	01	5,3	03	1,7
S. ohio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	14,3	-	-	02	1,2
S. oranienburg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	05	26,3	05	2,9
S. senftenberg	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. give	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. mbandaka	05	5,0	-	-	01	20,0	04	14,8	-	-	-	-	-	10	6,0	
S. newport	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. javiana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	10,5	02	1,2
S. montevideo	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. rubislaw	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	5,3	01	0,6
S. schwarzengrund	02	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	10,5	04	2,3
S. emek	02	2,0	-	-	-	-	01	3,7	-	-	01	7,1	-	-	04	2,3
S. saphra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	10,5	02	1,2
S. sandiego	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	10,5	03	1,7
S. gloucester	03	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	03	1,7	
S. I 4,12:g,s,t:-	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. enterica subsp enterica cepa rugosa	04	3,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	10,5	06	3,5
S. ealing	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. albany	05	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	05	2,9	
S. arechavaleta	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. livingstone	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. lexington	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. I 9,12:-:-	01	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,6	
S. I 1,3,19:-:-	02	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	1,2	
S. belem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	5,3	01	0,6
<b>TOTAL</b>	<b>101</b>	<b>59,7</b>	<b>01</b>	<b>0,6</b>	<b>05</b>	<b>3,0</b>	<b>27</b>	<b>16,0</b>	<b>02</b>	<b>1,2</b>	<b>14</b>	<b>8,3</b>	<b>19</b>	<b>11,2</b>	<b>169</b>	<b>100,0</b>

Almeida, I. A.Z.C. et al. *Salmonella*: serotypes identified in the São José do Rio Preto area, SP, during the period of 1990 - 1999. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):33-37, 2000

**ABSTRACT.** From January 1990 to December 1999, 324 *Salmonella* strains were isolated at Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto–SP Lab. I, 155 from human infections and 169 from food for human consumption. *S. enterica* subsp. *Enterica* serotype *enteritidis* (*S. enteritidis*) was the most prevalent serotype (75.0%) among the 17 different ones identified in human infections. Fecal material represented the main human source of the isolated strains, due to several foodborne outbreaks occurring in the period under study. Thirty different serotypes were identified in food, *S. enteritidis* being the prevailing one. About 26.6% of the analyzed foods were linked to foodborne outbreaks. Foods presenting the highest rate of isolated strains were meat and its products (59.7%), followed by eggs and egg products (16.0%). These results show that *S. enteritidis* still remains as the most common serotype isolated from human sources and foods. Foods frequently implicated in foodborne outbreaks are chicken meat and eggs, as well as their products, particularly raw and undercooked ones.

**KEY WORDS.** *Salmonella*; *Salmonella* serotypes; *Salmonella* in foods; *Salmonella* in clinical materials.

## REFERÊNCIAS

1. Araujo, E. et al. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. **Hig. Alimentar**, 9(40): 24-6, 1995.
2. Brenner, D.J. Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. In: Krieg, N.R.; Holt, J.G. ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Ed. Willians and Wilkins; 1984. 1v, p. 427-58.
3. Caffer, M.I.; Eiguier, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, 21:15-9, 1994.
4. Centers For Disease Control. Outbreak of *Salmonella enteritidis* infection associated with consumption of raw shell eggs, 1991. **MMWR**, 41(21):369-72, 1992.
5. Clark, G.M.; Kakufmann, A.F.; Gangarosa, E.J. Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*. **Lancet**, 1:490-3, 1973.
6. Eiguier, T.; Caffer, M.I.; Fronchkowsky, G.B. Importancia de la *Salmonella enteritidis* en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Argentina años 1986-1988. **Rev. Arg. Microbiol.**, 22:41-6, 1990.
7. Esper, M.R.M. et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, S.P., no período de 1978 – 1997. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 57(2): 45-50, 1998.
8. Ewing, W.H. In: **Edward's and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**, 4.<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier Science; 1986. 536p.
9. Flowers, S. et al. *Salmonella*. In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F., ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Ass.; 1992. p. 388-404.
10. Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. – Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: Franco, B.D.G.M. & Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Ed. Atheneu; 1996. p.55-60.
11. Fuzihara, T.O.; Nunes, S.M.; Dal Col, R. Surtos de toxinfecção por *Salmonella enteritidis*. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 18, Santos, 1995. **Anais....** p. 104.
12. Kaku, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 29: 127-31, 1995.
13. Mota, C.C.S. et al. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em Curitiba–PR, Brasil /julho de 1981. **Hig. Alim.**, 2: 123-31, 1983.
14. Peresi, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*. **Rev. Saúde Pública**, 32(5): 477-83, 1998.
15. Pessoa, G.V.A. et al. Ocorrência de bactérias enteropatógenicas em São Paulo, no septênio 1970-76. I – Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 38: 87-105, 1978.
16. Pessoa, G.V.A.; Silva, E.A.M. Milieux pour l'identification présomptive rapide des enterobactéries des aéromonas et des vibrions. **Ann. Microbiol.**, 125: 341-7, 1974.
17. Pissani, B. et al. *Salmonella enteritidis*: elucidação de surtos ocorridos na região de Campinas, de setembro de 1994 a junho de 1995. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 18, Santos, 1995. **Anais....** p. 80.
18. Popoff, M.Y.; Le Minor, L. Formules antigéniques de sérovars de *Salmonella*. Paris. Centre Colalorateur OMS de Référence et de Recherches pour les *Salmonella*, 1997. p. 151.
19. Rodrigue, D.C.; Tauxe, R.V.; Rowe, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **Epidemiol. Infect.**, 105: 21-7, 1990.
20. Scuderi, G. et al. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-4. **Epidemiol. Infect.**, 116: 257-65, 1996.
21. Taunay, A.E. et al. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmoneloses in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 38(2): 119-127, 1996.
22. Tavechio, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop., S. Paulo**, 38(5): 315-22, 1996.

Recebido em 07/04/2000; Aprovado em 04/09/2000

# Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado<sup>1</sup>

Physicochemical and sanitary-hygienic evaluation of fresh bottled and pasteurized orange juices

Maria Helena IHA<sup>2\*</sup>  
Rosa Maria D. FÁVARO<sup>2</sup>  
Marina M. OKADA<sup>2</sup>  
Sônia de Paula T. PRADO<sup>2</sup>  
Alzira Maria M. BERGAMINI<sup>2</sup>  
Maria Aparecida de OLIVEIRA<sup>2</sup>  
Neusa S. GARRIDO<sup>2</sup>

RIALA6/881

Iha, M.H. et al. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado<sup>1</sup>. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):39-44, 2000

**RESUMO.** O suco de laranja é um alimento rico em nutrientes e muito consumido em diversas partes do mundo. Ribeirão Preto e Araraquara são cidades do interior do Estado de São Paulo - Brasil, nas quais surgiram nos últimos anos, muitas processadoras de suco de laranja fresco e pasteurizado. O objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco e pasteurizado produzidos e/ou comercializados nessas duas cidades. Foram analisadas 130 amostras de suco fresco provenientes de diferentes processadoras de suco de laranja localizadas em Ribeirão Preto e Araraquara e 33 amostras de suco pasteurizado de processadoras localizadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo. Os resultados desse estudo mostraram que 48,5% das amostras de suco fresco apresentaram-se fora dos padrões físico-químicos estabelecidos pela legislação brasileira, 6,1% estavam em desacordo quanto ao exame microscópico e 50,0% quanto ao microbiológico. Dentre as amostras de suco pasteurizado, 9,1% e 15,6 % apresentaram-se fora dos padrões quanto às análises físico-químicas e ao exame microscópico, respectivamente. Nenhuma das amostras de suco fresco pasteurizado apresentou-se fora dos padrões microbiológicos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Suco de laranja fresco; suco de laranja fresco pasteurizado; características físico-químicas; qualidade higiênico-sanitária e legislação.

## INTRODUÇÃO

O suco de laranja é um alimento rico em nutrientes<sup>21</sup> e muito consumido em diferentes partes do mundo. Nos últimos

anos, devido principalmente à conscientização sobre as propriedades nutricionais das frutas e dos sucos naturais, o interesse do consumidor pelo suco fresco refrigerado com pequena vida útil de prateleira vem aumentando<sup>9</sup>. O suco fresco e o suco

<sup>1</sup> Trabalho realizado na Seção de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto.

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto – Rua Minas, 877 – Campos Elíseos – Ribeirão Preto-SP – CEP 14085-410 – Fone: (016) 625 5046 – R. 22 ou 24 E-Mail: mhiha@ig.com.br

fresco pasteurizado com sabor e aroma mais próximo do suco fresco espremido manualmente tem tido uma considerável aceitação em diversas partes do mundo como Estados Unidos, Europa<sup>5</sup>, Japão e Brasil.

O suco de laranja apresenta características físico-químicas próprias, sendo que algumas destas possuem estreita relação com fatores climáticos, variedade da fruta, grau de maturação, tipo de solo e irrigação<sup>21</sup>. Até o final de 1999, a Portaria n° 371 de 9 de setembro de 1974<sup>7</sup> estabelecia os parâmetros físico-químicos para suco de laranja. No decorrer de 1996 o Ministério da Agricultura publicou os ofícios circulares 04/96<sup>15</sup> e 05/96<sup>16</sup> alterando provisoriamente essa Portaria quanto a graus Brix, sólidos em suspensão e vitamina C. Recentemente, o Ministério da Agricultura e Abastecimento publicou a Instrução Normativa n° 1 de 7 de janeiro de 2000<sup>6</sup>, a qual estabelece os padrões de identidade e qualidade para o suco de laranja no país e que está em vigor desde a data da sua publicação.

As condições higiênico-sanitárias desses sucos também são estabelecidas pela legislação brasileira<sup>6,7</sup> sendo que, principalmente no caso do suco fresco, as condições de higiene devem ser muito bem controladas, para não oferecer risco ao consumidor e também para que o mesmo tenha uma vida útil de prateleira suficiente para sua comercialização.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de laranja do mundo<sup>5,12</sup>, sendo que a maioria dos produtores se concentra no Estado de São Paulo<sup>10,12,21</sup> na região de Limeira, Araraquara, Bebedouro e Araras, onde se instalaram diversas indústrias de suco de laranja fresco e concentrado<sup>10</sup>. Com o aparecimento destas indústrias processadoras de laranja, estas regiões se tornaram zonas citrícolas estáveis<sup>10</sup>, melhorando o padrão e a qualidade desta fruta.

Nas regiões de Ribeirão Preto e Araraquara, onde existem grandes plantações de laranja, surgiram muitas processadoras de suco que o comercializam como suco fresco ou suco fresco pasteurizado acondicionados em garrafas plásticas ou Tetra Brik®. Grande parte das processadoras de suco fresco não tem registro do produto no Ministério da Agricultura e nem um controle de qualidade adequado. O produto é vendido principalmente por ambulantes nas ruas, ou estabelecimentos comerciais tais como padarias e supermercados, onde algumas vezes o suco é extraído no próprio local através de uma máquina extratora<sup>17</sup>.

Com a produção e consumo crescentes do suco de laranja pronto para beber, a avaliação adequada de tais produtos torna-se relevante. O Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, juntamente com as Vigilâncias Sanitárias das Prefeituras de Ribeirão Preto e Araraquara iniciaram um monitoramento das diferentes marcas de suco de laranja comercializadas nestas cidades. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco e do fresco pasteurizado, consumido nas cidades de Ribeirão Preto e Araraquara-SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostra

Foram analisadas 130 amostras de suco de laranja fresco, provenientes de 36 processadoras, das quais 25 estão localizadas em Ribeirão Preto e 11 em Araraquara, e 33 amostras de suco fresco pasteurizado de 10 diferentes processadoras de suco, localizadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo. As amostras foram coletadas no decorrer de 2 anos, sendo que de cada processadora foram analisadas de 2 a 5 amostras ao longo desse período.

### 2. Procedimentos

As amostras de suco de laranja foram coletadas nas processadoras pelas Vigilâncias Sanitárias Municipais das cidades de Ribeirão Preto e Araraquara, e as amostras de suco pasteurizado foram adquiridas nos supermercados das duas cidades. As amostras foram transportadas em caixa térmica sob temperatura máxima de 10°C e, ao chegarem no laboratório, era coletada uma alíquota para a análise microbiológica e o restante utilizado para as análises microscópica e físico-químicas.

#### 2.1 Análise físico-química

Os parâmetros físico-químicos analisados se referiam à: densidade relativa a 20°C, utilizando densímetro; sólidos solúveis expressos em graus Brix a 20°C; acidez total, expressa em ácido cítrico anidro (g/100g); teores de ácido ascórbico (mg/100g); glicídios redutores, expressos em glicose (g/100g); glicídios não-redutores, expressos em sacarose (g/100g); açúcares totais, naturais da laranja (g/100g) e corantes orgânicos artificiais conforme métodos descritos no livro de Normas Analíticas do IAL<sup>11</sup>. Os sólidos em suspensão (% v/v) e a relação de sólidos solúveis em Brix/acidez em g/100g de ácido cítrico anidro foram determinados de acordo com os métodos descritos na legislação brasileira<sup>7</sup>.

#### 2.2 Análise microscópica

A análise microscópica do suco de laranja foi realizada de acordo com o método descrito na A.O.A.C.<sup>4</sup>, com modificações para determinação de sujidades leves por flutuação e filtração do resíduo<sup>22</sup>. Para a pesquisa de sujidades leves utilizou-se 250 g de amostra que foram transferidas para um frasco-armadilha de Wildman. A etapa da extração da camada oleosa para o béquer foi realizada duas vezes com 40 mL de óleo mineral, seguido de filtração a vácuo. O resíduo foi examinado ao microscópio estereoscópico e, quando necessário, o resultado era confirmado no microscópio óptico composto.

Para a pesquisa da presença de larvas e ovos de insetos, o resíduo do frasco-armadilha foi transferido para a peneira n° 140 e lavado com jatos de água filtrada. Filtrado a vácuo em tecido escuro, o material foi examinado ao microscópio

estereoscópico e, em caso de dúvida, o resultado era confirmado no microscópio óptico composto.

Os elementos histológicos da fruta foram examinados ao microscópio óptico composto e a confirmação foi feita por comparação com padrões e literatura específica<sup>14</sup>.

### 2.3 Análise microbiológica

As análises microbiológicas realizadas se referiam à: determinação do número mais provável (NMP) de bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP/mL); enumeração de bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella sp.*, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor<sup>8</sup>.

A determinação do NMP de coliformes de origem fecal foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela APHA<sup>2</sup>, substituindo-se o caldo Lauryl tryptose pelo caldo Lactosado (concentração dupla e simples).

A contagem de bolores e leveduras foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela APHA<sup>3</sup> utilizando-se Potato Dextrose Agar acidificado com ácido tartárico 10%.

A pesquisa para presença de *Salmonella sp.* foi avaliada de acordo com a APHA<sup>2</sup>, com adaptações referentes ao preparo da amostra para o pré-enriquecimento: homogeneização de 25mL do suco em 225mL de água peptonada tamponada 1%, incubados durante 18–24h a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os meios de enriquecimento seletivo usados foram caldo selenito, caldo tetrationsato segundo Kauffmann e caldo Rappaport-Vassiliadis, incubados a  $42^\circ\text{C}$  durante 48 h. Em seguida, o material foi plaqueado em Brilliant Green agar e MacConkey agar e incubado durante 18–24h a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . As colônias que apresentaram características semelhantes às da *Salmonella sp.* foram isoladas em meio IAL<sup>19</sup> identificação presuntiva.

### 3. Avaliação da Qualidade do Suco de Laranja

Os resultados obtidos na análise físico-química foram

comparados com os valores estabelecidos pela Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000 – Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para o suco de laranja – do Ministério da Agricultura e Abastecimento<sup>6</sup>. Os resultados obtidos na análise microbiológica foram comparadas com os valores padrões estabelecidos pela legislação em vigor – Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde<sup>8</sup> e os resultados da análise microscópica foram comparados com os valores estabelecidos pelo Decreto Estadual nº 12.486 de 20 de outubro de 1978<sup>23</sup> e Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000<sup>6</sup>.

## RESULTADOS

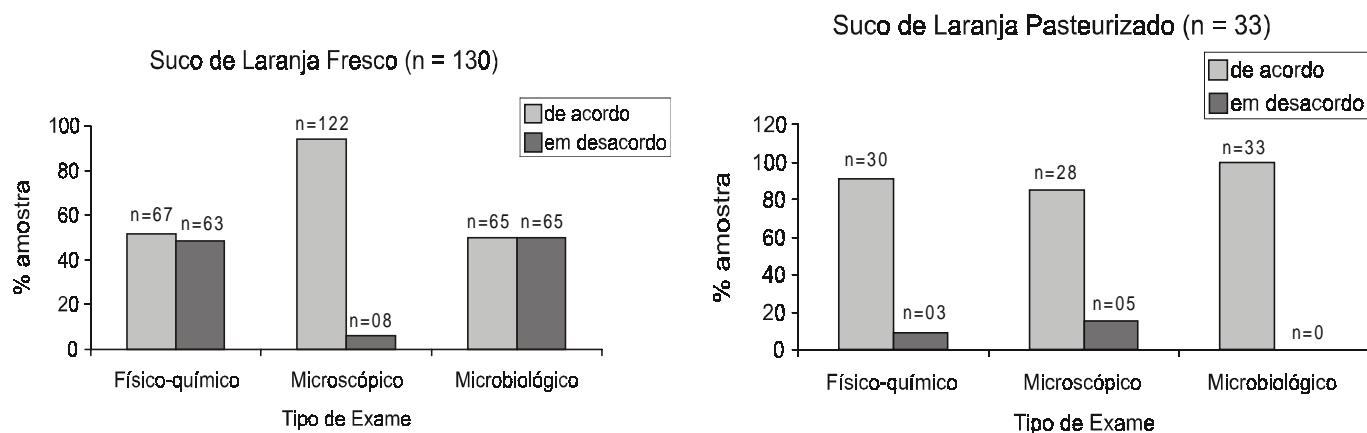
A Figura 1 mostra a porcentagem de amostras de suco de laranja fresco engarrafado e de suco pasteurizado, em desacordo com a legislação em vigor, quanto às análises físico-químicas e às análises microscópicas e microbiológicas.

Não foram encontrados corantes orgânicos artificiais em nenhuma das amostras de suco fresco ou pasteurizado avaliadas.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de todos os parâmetros físico-químicos avaliados e na Tabela 2, distribuição de coliformes fecais, bolores e leveduras nas amostras de suco de laranja pasteurizado e comercializados nas cidades de Ribeirão Preto e Araraquara-SP.

## DISCUSSÃO

Como mostra a Figura 1, dentre as 130 amostras de suco fresco analisadas, 48,5% (63) estavam em desacordo com



**Figura 1.** Avaliação físico-química e higiênico-sanitária dos sucos de laranja fresco e pasteurizado, comercializados nas cidades de Araraquara e Ribeirão Preto-SP

**Tabela 1.** Características físico-químicas dos sucos de laranja fresco e pasteurizado comercializados nas cidades de Ribeirão Preto e Araraquara-SP

Parâmetro	Valores estabelecidos na legislação <sup>6</sup>	Média ± DP (*)		Variação	
				Mínimo - Máximo	
		pasteurizado (n = 33)	fresco (n = 130)	pasteurizado (n = 33)	fresco (n = 130)
Densidade relativa a 20°C	-	1,043 ± 0,004	1,041 ± 0,005	1,035 - 1,050	1,031 - 1,057
Graus Brix solúveis a 20°C	Mín. 10,5	11,3 ± 1,0	10,4 ± 1,2	9,0 - 13,2	8,0 - 14,5
Acidez (g/100g ácido cítrico anidro)	-	0,71 ± 0,12	0,82 ± 0,23	0,44 - 1,00	0,37 - 1,80
Relação de sólidos solúveis em °Brix/Acidez em g/100g ácido cítrico anidro	Mín. 7,0	16,4 ± 2,9	13,6 ± 4,2	11,2 - 25,9	6,1 - 34,5
Ácido ascórbico (mg/100g)	Mín. 25,00	39,9 ± 7,9	47,7 ± 9,0	25,1 - 58,1	21,5 - 76,0
Açúcares redutores (g glicose/100g)	-	4,6 ± 0,7	4,2 ± 0,9	3,3 - 6,5	1,6 - 6,9
Açúcar não redutor (g sacarose/100g)	-	3,5 ± 0,8	3,8 ± 1,2	1,9 - 5,8	0,7 - 8,8
Açúcares totais (g/100g)	Máx. 13,0	8,1 ± 1,0	7,9 ± 1,4	6,1 - 11,2	5,7 - 13,0
Sólidos em suspensão (% , v/v)	-	5,3 ± 1,3	6,9 ± 1,7	3,0 - 9,0	3,0 - 12,5

\* média ± Desvio Padrão

- valores não estabelecidos na legislação<sup>6</sup>

**Tabela 2.** Distribuição de coliformes fecais, bolores e leveduras nas amostras de suco de laranja fresco e pasteurizado comercializados nas cidades de Ribeirão Preto e Araraquara-SP

Microrganismos	Pasteurizado (n=33)		Fresco (n=130)	
	n	%	n	%
Coliformes fecais(NMP/mL)				
< 10	33	100	113	86,9
≥ 10	0	0	17	13,1
Bolores (UFC/mL)				
< 10 <sup>4</sup>	33	100	125	96,1
≥ 10 <sup>4</sup>	0	0	5	3,9
Leveduras (UFC/mL)				
< 10 <sup>4</sup>	33	100	74	56,9
≥ 10 <sup>4</sup>	0	0	56	43,1

os padrões físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000<sup>6</sup>, sendo que 2 amostras apresentaram ácido ascórbico inferior a 25 mg/100g, 60 amostras apresentaram sólidos solúveis em Brix inferior a 10,5 e 2 amostras a relação sólidos solúveis em Brix/acidez em g/100g de ácido cítrico anidro inferior a 7,0 g.

O teor mínimo de ácido ascórbico exigido para o suco fresco na Portaria nº 371 de setembro de 1974 era de 38mg/100g. Atualmente de acordo com Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000<sup>6</sup> esse teor mínimo passa para 25mg/100g. Dentre as amostras de suco fresco estudadas treze apresentaram conteúdo de ácido ascórbico inferior a 38mg/100g e apenas duas conteúdo inferior a 25mg/100g. Sabe-se que o teor de ácido ascórbico varia de acordo com a

variedade, estágio e maturação da fruta, variações climáticas<sup>21</sup>, condições e tempo de armazenamento<sup>1,18</sup> e como mostram os nossos dados, o conteúdo de vitamina C dos frutos da região estudada é na maioria das vezes bastante superior ao mínimo exigido na legislação atual, constituindo importante fonte desse nutriente.

O valor Brix mínimo estabelecido para o suco de laranja na portaria 371 de setembro de 1974 era de 10,5. No entanto, a partir de abril de 96, o mesmo deixou de ser exigido para suco de laranja, conforme circular 04/96<sup>15</sup> do Ministério da Agricultura.

Porém, a Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000 voltou a estabelecer para o suco de laranja o valor mínimo de 10,5 para graus Brix e, dessa forma, 60 das amostras estudadas apresentaram valores inferiores ao referido acima. Como o valor Brix indica o estágio de maturação da laranja, os dados encontrados nesse estudo podem sugerir a utilização de frutos verdes. Por outro lado, apenas 2 das amostras estudadas apresentaram a relação graus Brix/acidez abaixo dos limites estabelecidos na mesma Normativa.

Quanto ao suco de laranja pasteurizado, dentre as 33 amostras analisadas 9,1% (3) apresentaram sólidos solúveis em graus Brix abaixo do valor mínimo. Quanto aos outros parâmetros físico-químicos todos estavam de acordo com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos na legislação.

Os valores obtidos para a densidade e sólidos em suspensão estão apresentados na Tabela 1, mas não foram comparados com os padrões estabelecidos na legislação, pois não constam dos padrões de identidade e qualidade para o suco de laranja estabelecidos na Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000<sup>6</sup>.

Na análise microscópica foram encontrados ácaros, larvas, insetos ou fragmentos de insetos em 6,7% (7) e 15,6% (5) amostras de suco fresco e de suco fresco pasteurizado, respectivamente. Este tipo de contaminação ocorreu, provavelmente, devido à condição precária da fruta e/ou falta de higiene ambiental no armazenamento ou mesmo durante o processo de extração do suco. Os elementos histológicos da fruta cítrica foram identificados em todas as amostras analisadas.

Foram encontradas sementes (parte não comestível da fruta) em 02 amostras de suco fresco de laranja. Nas indústrias de suco de laranja concentrado existe um controle de qualidade da laranja utilizada como matéria-prima e do produto acabado. Nestas indústrias, a fruta é comprada diretamente do produtor e chega à indústria ainda fresca. A laranja é submetida a etapas de escolha manual e/ou seleção mecânica, lavagem e, após a extração, passa por um sistema de peneiramento e ciclonação<sup>12,20</sup>, o que inclusive reduz os sólidos em suspensão (Tabela 1). A maioria das processadoras de suco de laranja fresco não tem este controle utilizando as laranjas fornecidas pelo mercado, onde a filtração do suco é feita apenas na máquina extratora, não existindo nenhum controle de qualidade do produto acabado.

Quanto a análise microbiológica, pode-se observar na Tabela 2 que das 130 amostras de suco fresco, 13,1% (17) apresentaram coliformes fecais, 3,9% (5) bolores e 43,1% (56) leveduras acima dos limites máximos permitidos na legislação. Existe uma tolerância para os valores dos padrões microbiológicos para esses microrganismos, uma vez que é praticamente impossível verificar sua ausência em produtos de origem natural (vegetal), porém, nas amostras estudadas, a frequência de níveis acima do tolerado foi alta, especialmente para leveduras.

Por outro lado, durante visita técnica às processadoras de suco fresco, observou-se que as condições higiênico-sanitárias das mesmas variaram de locais limpos, equipados com lâmpadas e mata-moscas, até locais sujos, apresentando fortes odores de laranja podre e presença de insetos e animais domésticos.

Para manter a condição de consumo, o suco pronto para beber (pasteurizado ou não) deve ser conservado em recipiente fechado e mantido sob refrigeração<sup>9</sup>. No caso das processadoras que foram visitadas, o suco era engarrafado logo após a extração e conservado refrigerado ou então armazenado em carrinhos, denominados “laranjinhas”, para a venda direta ao consumidor ou abastecimento de supermercados, padarias, etc.

Os resultados das 33 amostras de suco fresco pasteurizado analisadas estavam de acordo com a legislação em vigor quanto aos padrões microbiológicos, apesar de terem sido observados insetos e fragmentos de insetos em 15,6 % das amostras estudadas. O suco de laranja fresco pasteurizado é submetido a um processo de pasteurização que elimina a grande maioria dos microrganismos existentes<sup>10</sup>, e aumentando desta forma a vida de prateleira do suco<sup>13,17</sup>. Não foram realizadas

visitas aos estabelecimentos das processadoras de suco pasteurizado, mas cabe ressaltar que a maioria delas é dotada de controle de qualidade.

Todas as processadoras de suco fresco pasteurizado estudadas tinham o registro do produto no Ministério da Agricultura, bem como rotulagem correta. Das 130 amostras de suco fresco, 31 amostras não tinham registro no órgão competente, 20 amostras não continham os dizeres de rotulagem de forma correta, principalmente quanto ao nome, local de extração ou prazo de validade e 01 amostra não continha sequer o rótulo.

As irregularidades observadas nos rótulos e não observância dos registros das amostras de suco fresco decorrem do fato das processadoras de tais sucos serem estabelecimentos mais simples, e não havendo uma preocupação com estes itens, uma vez que encarece o produto, cuja venda é realizada principalmente por ambulantes apenas na cidade onde é realizada a extração. A maioria das processadoras de suco de laranja fresco pasteurizado avaliada neste estudo consiste de empresas de médio e grande porte, cujos produtos são comercializados em diversas regiões do Brasil.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, o produto que oferece menor risco de saúde do consumidor é o suco que passou por um processo de pasteurização, pois oferece maior garantia das condições adequadas para o consumo, situação semelhante à observada para o leite.

Por outro lado, em algumas cidades como Ribeirão Preto e Araraquara a oferta do suco fresco atualmente é grande, sendo comercializado por ambulantes em diversos pontos da cidade, o que acaba gerando um aumento de consumo e por esta razão o controle desse produto pelas autoridades sanitárias deve ser constante.

Durante o desenvolvimento desse estudo, com a intensificação de fiscalização por parte das Vigilâncias Sanitárias em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto foi observado que muitas processadoras foram desativadas devido às condições higiênico-sanitárias e/ou econômicas. No início do estudo existiam 36 processadoras de suco fresco, das quais 31 não tinham registro do produto no Ministério da Agricultura. No final, restaram apenas 11 extratoras, sendo que 5 já tinham registro do produto e 3 delas estavam providenciando.

Segundo Decio e Gherardi<sup>9</sup>, tanto nos Estados Unidos como na Europa, não existia um padrão para uma correta denominação do suco até o ano de 1992, o que causava um abuso por parte dos extratores. No Brasil, alguns parâmetros ainda estão sendo estabelecidos e, devido ao aumento crescente do consumo, tornou-se necessária uma melhor caracterização desses parâmetros e os dados deste trabalho podem contribuir para esta finalidade.

Iha, M.H. et al. Physicochemical and sanitary-hygienic evaluation of fresh bottled and pasteurized orange juices. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):39-44, 2000

**ABSTRACT.** Orange juice is a food rich in nutrients and widely consumed throughout the world. During the last years many fresh bottled and pasteurized orange juice plants have settled in the cities of Ribeirão Preto and Araraquara, located in the State of São Paulo, Brazil. The objective of the present study was to evaluate the physicochemical and hygienic-sanitary quality of the fresh and pasteurized orange juices consumed in these cities. One hundred and thirty fresh and thirty-three pasteurized orange juice samples provided by different plants located in the Araraquara and Ribeirão Preto regions were analyzed. The results showed that for fresh juice 63 (48,5%) samples were in disagreement with physicochemical standards established by the legislation, 8 (6,1%) with relation to microscopic and 65 (50,0%) with relation to microbiological analysis. With regard to the pasteurized juice, 3 (9,1%) and 5 (15,1%) samples did not agree with the legislation according to physicochemical analysis and microscopic examination, respectively. No pasteurized juice sample was in disagreement with the microbiologic examination.

**KEY WORDS.** Fresh orange juice; fresh pasteurized orange juice; physicochemical characteristics; sanitary-hygienic quality; Brazilian legislation.

## REFERÊNCIAS

1. Akinyele, I.O.; Keshinro, O.O.; Akinnawo, O.O. Nutrient losses during and after processing of pineapples and oranges. **Food Chemistry**, 37(3): 181-8, 1990.
2. American Public Health Association. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3<sup>rd</sup> ed., Washington, D.C.: C. Vanderzant & D.F. Splittstoesser; 1992.
3. American Public Health Association. Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Marvin L. Speck, APHA; 1996.
4. Association Official Analytical Chemists. **Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 15<sup>th</sup> ed., Washington, D. C.: A.O.A.C.; 1990.
5. Bettini, M. F. M. **Estudo de aromas cítricos através de métodos sensoriais, cromatográficos e espectrofotométricos**. São Carlos, 1995. [Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo].
6. Brasil, leis, decretos, etc.... Instrução Normativa n°. 1 de 7 de janeiro de 2.000 do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**, 10 jan. 2000. Seção 1, 54-58.
7. Brasil, leis, decretos, etc.... Portaria n°. 371 de 9 de setembro de 1.974 do Ministério da Agricultura. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 jun. 1959. Seção 1, 26-27.
8. Brasil, leis, decretos, etc.... Portaria n° 451 de 19 de setembro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico – Princípios Gerais para o Estabelecimento de critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos.... **Diário Oficial da União**, 2 de julho de 1998. Seção 1, 4.
9. Decio, P.; Gherardi, S. Freshly squeezed orange juice. **Confructa Studien**, 36(5/6): 162-7, 1992.
10. Gava, J. A. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**, 7<sup>a</sup>. ed. Guarulhos, 1988.
11. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do IAL: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1, 3<sup>a</sup>. ed., São Paulo, 1985.
12. Marques, D.S. Citrus juice processing in Brazil. **Transactions of the Citrus Engineering Conference**, 39:71-84, 1993.
13. Martín, J.J.; Solanes, E.; Bota, E.; Sacho, J. Evolución química y organoléptica del zumo de naranja pasteurizado. **Alimentaria**, 261:59-63, 1995.
14. Menezes Jr, J.B.F. Investigação sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 9:18-77, 1949.
15. Ministério da Agricultura. Ofício Circular n°. 04/96 – GAB / CIV / DDIV / DAS, 20/03/96.
16. Ministério da Agricultura. Ofício Circular n°. 05/96 – GAB / CIV / CGIV / SDA.
17. Nisida, A.L.A.C. et al. Estabilidade de suco de laranja não pasteurizado, armazenado a 4°C. **Colet. ITAL**, 23(2): 173-80, 1993.
18. Pandolfo, S. C.N.; Faria, J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 19: 153-160, 1999.
19. Pessoa, G.V.A.; Silva, E.A.M. Milieu pour l’identification pr sumptive rapide des enterobact ries, des aeromonas et des vibrions. **Ann. Microbiol.**, 125A: 341, 1974.
20. Ragueneau Troccoli, I. Exporta es menores em 1994/95. **Agroanalysis**, 14(2): 19-20, 1994.
21. Rodriguez, O. et al. **Citricultura brasileira**. 2.ed., Campinas, Funda o Cargill, 1991.
22. Santos, M.C.; Rodrigues, R. M.M. S.; Zamboni, C. Q. Sucos de maracujá, tamarindo e uva: método de análise das condi es higi nicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 50(1/2): 239-243, 1990.
23. São Paulo. Leis, decretos, etc. Decreto Estadual n°. 12.486 de 20 out. 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. **Diário Oficial**, São Paulo. (NTA 22 e 24).

Recebido em 29/06/2000; Aprovado em 11/10/2000



## Incidência de parasitos da família Anisakidae em bacalhau (*Gadus morhua*) comercializado no Estado de São Paulo

Incidence of Anisakidae (*Gadus morhua*) parasites in the cod fish marketed in the  
State of São Paulo

Amélia D. PEREIRA<sup>1\*</sup>

Marcia B. ATUI<sup>1</sup>

Domingas M. A. G. V. TORRES<sup>2</sup>

Ana Célia S. MANGINI<sup>2</sup>

Claydes Q. ZAMBONI<sup>1</sup>

RIALA6/882

Pereira, A.D. et al. Incidência de parasitos da Família Anisakidae em bacalhau (*Gadus morhua*) comercializado no Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):45-49, 2000

**RESUMO.** Vermes da família Anisakidae são nematóides parasitas do aparelho gástrico de mamíferos marinhos como focas, baleias e golfinhos. Larvas destes parasitas são encontradas freqüentemente em carne de salmão, bacalhau, arenque, atum, hadoque, linguado (hospedeiros intermediários). A infecção humana resulta do hábito do homem se alimentar com peixe cru, insuficientemente cozido, congelado, salgado ou defumado, contendo larvas infectantes vivas do nematóide. As espécies mais comumente envolvidas na infecção humana são *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens*. O objetivo deste trabalho é registrar a ocorrência de larvas da família Anisakidae em bacalhau comercializado no Estado de São Paulo. Foram analisadas 22 amostras de bacalhau importado, provenientes da Delegacia do Consumidor (Decon), do Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo e de empresas particulares, entre dezembro de 1997 e dezembro de 1998. Foram encontrados nematóides em 9 das amostras analisadas (40,91%) sendo que 6 (27,27%) pertenciam à família Anisakidae, gêneros *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Os autores alertam as autoridades sobre a possibilidade desta infecção ocorrer devido ao aumento de consumo de “sushi” e “sashimi”.

**PALAVRAS-CHAVE.** Nematóides parasitas; família Anisakidae; pescado; bacalhau.

### INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias adquiridas através dos alimentos têm sido descritas há muito tempo, e continuam sendo de grande importância em muitas regiões do mundo. Muitos parasitas têm complexos ciclos de vida, os quais têm como fator característico a troca de hospedeiros em determinada fase da evolução<sup>32</sup>.

Anisakiase é uma importante infecção transmitida por peixes e causada por larvas do terceiro estágio ( $L_3$ ) de nematóides da família Anisakidae. Os primeiros casos foram atribuídos ao nematóide *Anisakis marina*<sup>32,37</sup>. A taxonomia vem mudando com freqüência e atualmente as espécies mais comuns envolvidas são *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens*.

A primeira descrição da anisakiase humana ocorreu na Holanda em 1960<sup>35</sup> e em seguida foram relatados casos no

<sup>1</sup> Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz

<sup>2</sup> Seção de Enteroparasitoses – Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902 – São Paulo, SP.

Japão<sup>18,33,36,37</sup>, onde a população tem o hábito difundido e amplamente aceito de consumir carne de peixe crua, como *sushi* e *sashimi*, e onde a anisakiase é considerada problema de Saúde Pública<sup>37</sup>.

Atualmente são muitos os relatos sobre o encontro de larvas do terceiro e quarto estágios do nematóide no homem, nos EUA<sup>6,13,16,17</sup>, França<sup>7,9,24</sup>, Itália<sup>22</sup>, Espanha<sup>2</sup>, Noruega<sup>10</sup> e Chile<sup>20</sup>.

O ciclo de vida do parasito ocorre em regiões mais frias dos oceanos<sup>10</sup>; envolve dois hospedeiros intermediários e a possibilidade de grande número de hospedeiros paratênicos (peixes marinhos)<sup>8,32</sup>. O verme adulto parasita o estômago e intestino delgado de mamíferos marinhos como baleia, golfinho, leão marinho, foca e morsa. Os ovos eliminados nas fezes, sofrem, na água, o desenvolvimento larvário, onde as larvas são ingeridas pelo primeiro hospedeiro intermediário, crustáceos, como camarão (krill). Os hospedeiros secundários são peixes que se alimentam de crustáceos, adquirindo as larvas do terceiro estágio que migram para as cavidades ou musculaturas. Os peixes mais conhecidos por albergarem a larva do terceiro estágio são: bacalhau, arenque, hadoque e salmão<sup>7</sup>. No Brasil, Rego et al.<sup>25</sup> encontraram anchovas parasitadas por larvas de *Anisakis sp* e São Clemente et al.<sup>28</sup> analisaram 70 amostras de peixe espada do litoral do Rio de Janeiro, observando que 20,0% das amostras estavam parasitadas por larvas de *Anisakis sp.*, 70,0% por *Phocanema sp.* e 100,0% por *Contracaecum sp.*

Geralmente, a infecção humana ocorre com a presença de uma única larva no trato digestivo, mucosa gástrica ou intestinal, podendo raramente ocorrer casos com algumas dezenas de larvas. As mais frequentemente encontradas pertencem ao terceiro estágio de desenvolvimento<sup>7</sup>; porém, já foram relatados encontros de L<sub>4</sub> parasitando o homem<sup>15,17</sup>.

A doença provocada por nematóides do gênero *Anisakis* ocorre com menor frequência em relação à provocada pelo gênero *Pseudoterranova*, e é mais grave, invasiva e geralmente a larva se localiza na mucosa intestinal do homem<sup>19,29</sup>. As larvas do gênero *Pseudoterranova*, antigo *Phocanema*<sup>11,16</sup>, podem invadir a mucosa gástrica<sup>1,24</sup> porém, com maior frequência, não conseguem se fixar e são eliminadas junto ao vômito, através da tosse, pelas fezes ou são colhidas da garganta<sup>15,17</sup>. É significativa a observação de que a infecção humana por larvas de *Anisakis sp* são detectadas por biópsia enquanto as larvas do gênero *Pseudoterranova* são visualizadas quando eliminadas oralmente ou pelas fezes. Germano e Germano<sup>8</sup> consideram estes casos assintomáticos, uma das razões da ausência de relatos em países onde o hábito de consumir pescado cru ou semi-cru é adotado por alguns segmentos da população. A localização também pode ser extragastrointestinal, cavidade abdominal<sup>16</sup>, mesentério<sup>32</sup>, pulmão<sup>14,18</sup> e músculo lingual<sup>8</sup>.

O quadro de sintomas<sup>1,19,20,24,36</sup> composto por náuseas, vômito, distúrbios gastrointestinais, dor epigástrica e abdominal, febre baixa, leucocitose e eosinofilia, ocorre entre duas

horas após a ingestão do pescado contaminado até as duas primeiras semanas da infecção. Com a evolução do quadro pode haver hemorragia gástrica, perda de peso ou obstrução intestinal, sugerindo tumor<sup>36,37</sup>, porém a maioria dos casos relatados são agudos, confundindo com quadros de apendicite<sup>2,26,34</sup>. Na literatura há casos de anisakiase associada a quadros reumatológicos<sup>2,7</sup> e de infecção pulmonar<sup>14,18</sup>, assim como intensas reações alérgicas<sup>1</sup>, principalmente nas infecções crônicas.

O melhor tratamento para a anisakiase é a profilaxia. As larvas não sobrevivem a temperaturas maiores que 60°C por 10 minutos e abaixo de -20°C por 24 horas<sup>1,8,31</sup>. Segundo Alonso et al.<sup>1</sup> *apud* Kasuya et al. (1990), a ingestão de carne de peixes bem cozidos, mas contendo larvas mortas, podem ser danosos à população, causando processos alérgicos.

Existe grande dificuldade em diferenciar gêneros e espécies da família Anisakidae<sup>21</sup>. As larvas dos dois gêneros podem ser encontradas em vísceras e músculos dos peixes. Os detalhes morfológicos de esôfago e intestino, como a verificação da ausência ou presença de cecum, são difíceis de visualizar e interpretar nos estágios larvários, não permitindo, desta forma, a identificação de gênero ou espécie a que pertencem<sup>21</sup>. Em geral, morfológicamente, as larvas de *Pseudoterranova* se apresentam frouxamente enroladas no tecido e possuem cor “amarronzada” enquanto as larvas do gênero *Anisakis* são rosadas e mais fortemente enroladas na musculatura<sup>3,13</sup>.

Desde 1993, o Instituto Adolfo Lutz vem recebendo amostras de bacalhau provenientes de denúncias de consumidores, que adquiriram bacalhau fresco e salgado em estabelecimentos comerciais e notaram algumas alterações em sua aparência observando a presença de parasitas nos mesmos. Procuraram então os órgãos de fiscalização para esclarecer o tipo de contaminação ocorrida no peixe.

O objetivo deste trabalho foi verificar a incidência de nematóides em amostras de bacalhau comercializado no Estado de São Paulo pela identificação do nematóide através de sua morfologia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 22 amostras de bacalhau, sendo 19 seco e salgado e 3 amostras de bacalhau fresco, enviadas à Seção de Microscopia Alimentar da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, pela Delegacia de Consumidor – DECON, pelo Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, por outras Instituições Públicas e particulares e algumas amostras adquiridas no comércio da Capital do Estado de São Paulo de dezembro de 1997 a dezembro de 1998.

A análise para pesquisa de nematóides em amostras de bacalhau foi baseada no método descrito no Manual de Análise Microscópica de Alimentos<sup>38</sup>. Nas amostras analisadas as larvas encontravam-se inseridas na musculatura e na superfície do bacalhau que encontrava-se eviscerado. Após a retirada dos nematóides das amostras, foram enviados ao Laboratório de

Enteroparasitoses da Divisão de Biologia Médica para identificação dos gêneros.

As larvas foram clarificadas com lactofenol de Amman e coradas posteriormente pelo carmin clorídrico<sup>12,23</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 22 amostras de bacalhau salgado e fresco e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

As larvas L3 e L4 encontradas (Figuras 1 e 2) mediram entre 15 e 45 mm, com diâmetro entre 0,4 e 1,5mm, apresentando 3 lábios, pequeno dente na extremidade anterior e pequena estrutura tipo espículo na extremidade posterior. O esôfago apresentava porção muscular longa e porção ventricular. Em uma das amostras foram identificadas vinte quatro larvas de nematóides dos dois gêneros da família Anisakidae.



**Figura 1.** Larvas da família Anisakidae em bacalhau fresco (240x)



**Figura 2.** Larva obtida de bacalhau salgado, importado, corada pelo carmin clorídrico (320x)

**Tabela 1.** Número e porcentagem de amostras de bacalhau condenadas, contendo larvas de nematóides. São Paulo, 1998

Larvas de nematóides	Amostras de bacalhau	
	Nº	%
Família Anisakidae	6	66,66
Nematóide não-identificado	3	33,33
TOTAL	9	100,00

Na Tabela 1 pode-se observar que 6 (66,66%) das amostras continham nematóides da família Anisakidae e 3 (33,33%) nematóides não identificados, totalizando assim 9 (100,00%) de amostras impróprias para o consumo por conter nematóides.

**Tabela 2.** Número e porcentagem de amostras de bacalhau aprovadas e condenadas, segundo o tipo de bacalhau. São Paulo, 1998

Amostras de bacalhau	Fresco		Salgado		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%
Aprovadas	0	0,00	13	59,09	13	59,09
Condenadas	3	13,64	6	27,27	9	40,91
TOTAL	3	13,64	19	86,36	22	100,00

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, verifica-se que 9 (40,91%) das amostras foram condenadas por conter larvas de nematóides. Do total de 22 amostras de bacalhau, 6 apresentavam larvas da família Anisakidae, incluindo as 3 amostras de bacalhau fresco. Considerando a legislação de Ministério da Agricultura<sup>5</sup> para pescado curado, ela considera alterado o peixe que apresentar larvas ou parasitas. Em relação ao Decreto Lei Estadual nº 12.486 para conserva de pescado, a mesma exige ausência de sujidade, parasitas e larvas<sup>30</sup>.

Santos e Lodi<sup>27</sup> em 1998 relataram a ocorrência de *A. physeteris* Baylis, 1923 e *Pseudoterranova sp* em uma espécie de baleia, *Kogia breviceps* (De Blainville, 1983) (Physeteridae) encontrada no arquipélago de Fernando de Noronha. Os autores relataram o primeiro caso da incidência destes parasitas em baleia na região nordeste do Brasil, representando uma nova distribuição geográfica destes parasitos.

Barros e Cavalcanti<sup>4</sup> (1998) examinaram 113 espécimes de peixes provenientes do litoral nordeste do Brasil e encontraram larvas de Anisakídeos em 47 (41,59%). Entre os 82 pargos examinados, 46,34% estavam parasitados e entre os 18 dourados, 9 (50,00%) estavam parasitados com larvas de anisakídeos.

Devido à crescente popularidade dos restaurantes e *fast-food* brasileiros especializados em *sushi* e *sashimi*, acredita-se que em breve será possível observar os primeiros casos de anisakíase no Brasil. Por se tratar de infecção ainda não diagnosticada em nosso país, talvez pela dificuldade de diagnóstico diferencial com câncer gástrico, úlcera gástrica, carcinoma de cólon, apendicite, urticária e outras patologias, poderia estar ocorrendo subnotificação de casos por parte dos serviços médicos.

## CONCLUSÕES

A anisiquiase é uma doença parasitária de distribuição mundial. No Brasil ainda não existem registros de sua ocorrência no homem, embora larvas de Anisakidae tenham sido encontradas em peixes-espada<sup>28</sup>, anchovas<sup>25</sup>, pargos<sup>4</sup> e dourados<sup>4</sup>, capturados na costa brasileira. De acordo com esses autores e os resultados obtidos neste trabalho, pode-se considerar a anisiquiase uma zoonose emergente no país, principalmente em razão da vulgarização e aumento do consumo do pescado marinho cru, sob forma de *sushi* e *sashimi*, em restaurantes orientais, *fast-food*, áreas de alimentação em *shopping centers* e *deliveries*.

Outro fator que predispõe à infecção é a maior facilidade de viagens, atualmente, a turismo ou a negócios para países onde esses hábitos alimentares são comuns.

A abertura de mercado, favorecendo a importação de produtos marinhos, incluindo os frescos, defumados e salgados, pode colaborar na ocorrência de casos.

Por estas razões, a legislação brasileira de alimentos, no âmbito da Vigilância Sanitária, deveria prever normas e procedimentos específicos para o preparo de pratos à base de pescado marinho cru, defumado, insuficientemente cozido ou salgado, a exemplo de que foi adotado por outros países.

Os autores alertam as autoridades responsáveis pela importação e fiscalização do bacalhau, principalmente o fresco viscerado, em razão da alta incidência de larvas de nematóides da família Anisakidae encontradas na totalidade das amostras frescas analisadas e relatada neste trabalho, principalmente em razão do aumento do consumo do pescado marinho cru.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao funcionário Antônio Roberto de Souza Ferreira da Seção de Fotomicrografia do Instituto Adolfo Lutz e Nelson Oliveira da J. A. Oliveira S/A. Importação, Representações e Comércio, pela colaboração.

RIALA6/882

Pereira, A.D. et al. Incidence of Anisakidae (*Gadus morhua*) parasites in the cod fish marketed in the State of São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):45-49, 2000

**ABSTRACT.** Anisakid nematode parasites are adult worms that feed in the gastric tract of amphibians, reptiles, birds and mammals (whales and dolphins). Sea foods are the principal sources of human infections with these larval worms. These parasites are known to occur frequently in the flesh of cod, haddock, fluke, pacific salmon, herring, flounder, and monkfish. The disease is transmitted by raw, undercooked or insufficiently frozen fish and shellfish, and its incidence is expected to increase with the increase in the number of sushi and sashimi bars. The survey of cod marketed in the State of São Paulo is probably the first to be reported. This work deals with a parasitological survey of Anisakis from 22 samples. 9 (40,9%) were infected with nematodes, 6 of which (27,3%) belonged to the anisakidae family. Larvae from two genera, *Anisakis* and *Pseudoterranova*, of the family Anisakidae, have been definitely identified from human cases. Although anisakiasis is not a major public health problem, there is a need for regulation in the fish industry and for consumer information.

**KEY WORDS.** Nematode parasites; Anisakidae; cod.

## REFERÊNCIAS

1. Alonso, A.; Daschner, A.; Moreno-Ancillo, A. Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa. **N. Engl. J. Med.**, 337: 350-351, 1997.
2. Arenal Vera, J.J. et al. Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. **Rev. Esp. Enf. Digest.**, 79: 355-358, 1991.
3. Ash, L. e Orihel, T. **Atlas of Human Parasitology**, 4<sup>th</sup> ed. Chicago: ASCP Press; 1997.
4. Barros, C. Ge Cavalcanti, W. J. Larvas infectantes de Anisakídeos em peixes de elevado consumo, provenientes do litoral nordeste do Brasil. **Higiene Alimentar**, 12(58): 71-75, 1998.
5. Brasil. Leis, Decretos, etc. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-3-1952, alterado pelo Decreto nº 1.255, de 25-6-1962). Brasília, Ministério da Agricultura, p.74-79, 1980.
6. Chitwood, M. *Phocanema*-type larval nematode coughed up by a boy in California. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 24: 710-711, 1975.
7. Fabresse, F.X. et al. Polyarthrite de l'anisakiase. Premier cas. **La Presse Médicale**, 13 (16): 1004, 1984.
8. Germano, P.M.L. e Germano, M. I. S. Anisiquiase: zoonose parasitária emergente no Brasil? **Higiene Alimentar**, 12(54): 26-35, 1998.
9. Hubert, B.; Bacou, J.; Belveze, H. Epidemiology of human anisakiasis: incidence and sources in France. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 40: 301-303, 1989.
10. Jensen, T.; Andersen, K.; Des Clers, S. Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infections in demersal fish from two areas in Norway. **Can. J. Zool.**, 72: 598-608, 1994.
11. Kates, S.; Wright, K.A.; Wright, R. A case of human infection with the cod nematode *Phocanema sp.* **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 22: 606-608, 1973.
12. Khrustalev, A.; Hoberg, E.P. Carmine-propionic acid stain for elucidation of fine cellular structure in nematodes. **J. Parasitol.**, 82 (1): 176-178, 1996.

13. Kliks, M.M. Anisakiasis in the Western United States: four new case reports from California. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 32: 526-532, 1983.
14. Kobayashi, A.; Tsuji, M.; Wilbur, D.L. Probable pulmonary anisakiasis accompanying pleural effusion. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 34: 310-313, 1985.
15. Lichtenfels, J.R.; Brancato, F.P. Anisakid larva from the throat of an Alaskan Eskimo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 25: 691-693, 1976.
16. Little, M.D.; Macphail, J.C. Large nematode larva from the abdominal cavity of a man in Massachusetts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 21: 948-950, 1972.
17. Little, M.D.; Most, H. Anisakid larva from the throat of a woman in New York. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 22: 609-612, 1973.
18. Matsuoka, H. et al. A case report of serologically diagnosed pulmonary anisakiasis with pleural effusion and multiple lesions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 51: 819-822, 1994.
19. Mckerrow, J.H.; Sakanari, J.; Deardorff, T.L. Anisakiasis: Revenge of the sushi parasite. **N. Engl. J. Med.**, 319: 1228-1229, 1988.
20. Mercado, R.; Torres, P.; Maira, J. Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). **Rev. Saúde Pública**, 31: 178-181, 1997.
21. Myers, B.J. The nematodes that cause anisakiasis. **J. Milk Food Technol.**, 38: 774-782, 1975.
22. Maggi, P. et al. Gastrointestinal infection due to *Anisakis simplex* in southern Italy. **Eur. J. Epidemiol.**, 16(1): 75-8, 2000.
23. Pessoa, S.B.; Martins, A.V. **Parasitologia Médica**. 10<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977.
24. Pinel, C. et al. Gastric anisakidosis due to *Pseudoterranova decipiens* larva. **Lancet**, 347: 1829, 1996.
25. Rego, A.A. et al. Parasitas de anchovas, *Pomatotus saltatrix* (L.) do Rio de Janeiro. **Ciência e Cultura**, 35(9): 1329-1336, 1983.
26. Rushovich, A.M. et al. Omental Anisakiasis: A rare mimic of acute appendicitis. **Am. J. Clin. Pathol.**, 80: 517-520, 1983.
27. Santos, C.P. e Lodi, L. Occurrence of *Anisakis phyteris* Baylis, 1923 and *Pseudoterranova* sp. (Nematoda) in pygmy sperm whale *Kogia breviceps* (De Blainvillei, 1938) (Physeteridae) in northeastern coast of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93(2): 187-188, 1998.
28. São Clemente, S.C. et al. Análise do parasitismo de peixe espada *Trichiurus lepturus* L. do litoral do Rio de Janeiro – Brasil. **Parasitol. al Dia**, 19: 146-149, 1995.
29. Sakanari, J.A. et al. Intestinal Anisakiasis: A case diagnosed by morphologic and immunologic methods. **Am. J. Clin. Pathol.**, 90: 107-113, 1988.
30. São Paulo. (Estado). Leis, etc. Decreto no 12.486 de 20 de outubro de 1978. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 21 de out. 1978. (NTA 10).
31. Smith, J.W.; Woelten, R. Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp larval (Nematoda: Ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. **Int. J. Parasitol.**, 5: 133-136, 1975.
32. Smith, J.W.; Wootten, R. *Anisakis* e Anisakiasis. **Advances in Parasitology**, 16: 93-163, 1978.
33. Sugimachi, K. et al. Acute gastric anisakiasis. Analysis of 178 cases. **JAMA**, 253: 1012-1013, 1985.
34. Valdiserri, R.O. Intestinal anisakiasis. Report of a case and recovery of larvae from market fish. **Am. J. Clin. Pathol.**, 76: 329-333, 1981.
35. Van Thiel, P.H.; Kuipers, F.C.; Roskam, R. TH. A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. **Trop. geogr. Med.**, 2: 97-113, 1960.
36. Yokogawa, M.; Yoshimura, H. *Anisakis*-like larvae causing eosinophilic granulomata in the stomach of man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 14: 770-773, 1965.
37. Yokogawa, M.; Yoshimura, H. Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 16: 723-728, 1967.
38. Zamboni, C. Q. et al. **Manual de análise microscópica de alimentos**. [mimeografado]. São Paulo, 1986. p.63.

Recebido em 20/12/1999; Aprovado em 24/10/2000

# Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil

## Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a Hemodialysis Center in Campinas, São Paulo, Brazil

Beatriz PISANI<sup>1\*</sup>  
Marise SIMÕES<sup>1</sup>  
Maria Angela G. PRANDI<sup>1</sup>  
Marilu M. M. ROCHA<sup>1</sup>  
Célia R. GONÇALVES<sup>2</sup>  
Tânia M. I. VAZ<sup>2</sup>  
Kinue IRINO<sup>2</sup>

RIALA6/883

Pisani, B. et al. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):51-56, 2000

**RESUMO.** Foram analisadas amostras de água e de dializados coletados de diferentes pontos do sistema de hemodiálise de um Centro de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil, após um surto de bacteriemia ocorrido em setembro de 1996. As amostras foram submetidas à contagem de bactérias heterotróficas e pesquisa de coliformes totais, assim como foram realizadas as hemoculturas dos pacientes com bacteriemia. As cepas isoladas e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* foram submetidas à sorotipagem e à piocinotipagem e, naquelas pertencentes ao mesmo sorotipo e piocinotipo, procurou-se determinar o perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos e o ribotipo. Quanto à pesquisa de *Pseudomonas*, 80% das amostras correspondentes à segunda coleta foram positivas e em todas as amostras referentes à terceira coleta foram isoladas *Pseudomonas aeruginosa* ou *Bulkholderia cepacia*. Apenas uma cepa de *P.aeruginosa* de água pertencia aos mesmos sorotipo (O15) e piocinotipo (P10) daqueles obtidos dos pacientes. A compatibilidade genética das amostras das duas origens, verificada pela ribotipagem, sugere um veículo comum na propagação da infecção.

**PALAVRAS-CHAVE.** Hemodiálise; água; bacteriemia; *Pseudomonas aeruginosa*; sorotipagem; piocinotipagem; ribotipagem.

### INTRODUÇÃO

Pacientes renais crônicos submetidos ao processo de hemodiálise estão mais expostos à contaminação da água do que a população normal, resultando assim no risco de apresentar

reações pirogênicas e/ou bacteriemias, quase sempre associadas à reutilização de dializadores<sup>5,15</sup>.

Bacilos Gram negativos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*<sup>20</sup>, têm sido freqüentemente associados à ocorrência de surtos de bacteriemias por fluidos de diálise conta-

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, Campinas, S.P.

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz, S.P.

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Campinas – Rua São Carlos, 720 CEP 1305-420 Campinas – SP  
Tel/Fax (019)272-7977

minados, onde a desinfecção inadequada do sistema de tratamento da água e da máquina de diálise representam a principal causa na maioria dos surtos<sup>13,24</sup>.

Neste trabalho é relatado um surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*, ocorrido em setembro de 1996, em uma unidade de hemodiálise de um hospital localizado em Campinas, São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Caracterização do surto

O Centro de Hemodiálise é uma das unidades de um hospital geral, localizado em Campinas, São Paulo e constituído de três salas, sendo duas destinadas aos pacientes com sorologia negativa para HBsAg e a outra para pacientes com sorologia positiva para HBsAg. O surto teve início em 11 de setembro de 1996, quando três pacientes, de distintas salas, evidenciaram sinais de bacteriemia durante a hemodiálise. Em 16 de setembro, a equipe de Vigilância Epidemiológica local voltou a relatar a ocorrência de vários casos de bacteriemia nesta unidade, sendo indicada a realização da análise da água que abastece o Centro de Diálise. A última análise da água datando de maio/1996 apresentava contagem de microrganismos acima do padrão. Casos de bacteriemia continuaram mesmo após a revisão realizada pela empresa responsável pelo sistema de tratamento da água que abastece a unidade. Nesta data, 16 de setembro, foram coletadas amostras de sangue de 11 pacientes um dos quais foi a óbito. Entre 18 e 19 de setembro, foi realizada uma completa revisão do sistema de desmineralização da água. No entanto, casos de bacteriemia continuaram ocorrendo, razão pela qual todos os pacientes foram transferidos para outras unidades de hemodiálise da região. A partir de 23 de setembro, a unidade foi interditada e lacrada pela Vigilância Sanitária e amostras de água e dos dialisados foram coletados nesta data e repetidas em outras datas.

### 2. Coleta das amostras

Foram recolhidas 18 amostras de diferentes pontos do sistema de hemodiálise e em diferentes datas, especificadas no Quadro 1.

### 3. Análise das amostras

Com exceção das amostras A17 e A18, as demais foram submetidas à contagem de bactérias heterotróficas, às pesquisas de coliformes totais e de *Pseudomonas* spp. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Alimentar da Seção de Bromatologia e Química do Laboratório Regional de Campinas, seguindo as metodologias clássicas<sup>1</sup>. As cepas, com identificação presuntiva de *Pseudomonas* sp, foram encaminhadas à Seção de Bacteriologia – Laboratório Central, para a posterior caracterização.

### Quadro 1. Localização dos pontos de coleta das amostras no período de setembro a outubro de 1996

Data da coleta	Amostras e pontos de coleta
23.09.1996	Água do poço – A1 Água da rede municipal – A2 Água do reservatório (água da rede municipal+água do poço) – A3
25.09.1996	Máquina 1 – A4* Máquina 2 – A5 Máquina 3 – A6 Máquina 4 – A7 Máquina 5 – A8 Máquina 6 – A9 Máquina 7 – A10 Máquina 8 – A11 Máquina 9 – A12 Máquina 10 – A13
01.10.1996	Água da saída do reservatório – A14 Água coletada antes da entrada da máquina 10 – A15 Água coletada antes da entrada da máquina 5 – A16 Água da cápsula de filtro da máquina 5 – A17 Água da cápsula de filtro da máquina 10 – A18

\* dialisados das máquinas

### 4. Hemocultura

Das 11 amostras de sangue coletadas, 3 foram processadas no Laboratório do próprio hospital e 8 foram encaminhadas ao Setor de Bacteriologia do Laboratório Regional de Campinas. As hemoculturas foram realizadas seguindo os procedimentos recomendados pelo Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>. Todas as cepas isoladas foram encaminhadas ao Laboratório Central para as caracterizações fenotípica e genotípica.

### 5. Caracterização de espécies

As espécies do gênero *Pseudomonas* foram classificadas segundo o critério apresentado pelo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>27</sup>.

#### 5.1 Sorotipagem e Piocinotipagem

As cepas bioquimicamente caracterizadas como *Pseudomonas aeruginosa* foram sorotipadas segundo Lanyi e Bergan<sup>22</sup> e os piocinotipos determinados pela técnica descrita por Fyfe et al.<sup>14</sup>.

#### 5.2 Determinação do perfil de resistência aos agentes antimicrobianos

Nas cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* sorotipo O15, foi determinado o perfil de resistência aos seguintes antimicrobianos (Cecon – Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda., São Paulo, Brasil): amicacina (AM, 30mg), ampicilina (AP, 10mg), carbenicilina (CB, 100mg), cefalexina (CX, 30mg), cefalotina (CF, 30mg), cefoperazona (CZ, 75mg), ceftioxina (CO, 30mg), ciprofloxacina (CP, 5mg), cloranfenicol (CL, 30mg), gentamicina (GN, 10mg), tetraciclina

(TT, 30mg) e imipenem (IP, 10mg). Utilizou-se a técnica de antibiograma recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>26</sup>. Como controles foram utilizadas as seguintes cepas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### 5.3 Ribotipagem

Cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (quatro isoladas de sangue e uma isolada de água), que apresentavam as mesmas características fenotípicas, foram submetidas à extração de DNA cromossômico segundo Brenner et al.<sup>8</sup>. As amostras de DNA cromossômico purificado foram clivadas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, sendo os fragmentos de restrição separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos a vácuo para a membrana de *nylon*. Procedeu-se à hibridização com a sonda cDNA preparada por transcrição reversa a partir de rRNA<sup>29</sup>. O tamanho dos fragmentos foi estimado em relação ao tamanho dos fragmentos de DNA de *Haemophilus aegyptius* 3031 clivado com a enzima *EcoRI* (fragmentos com tamanhos variando de 1.5 a 17 kb), utilizado como referência de tamanho molecular. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados no programa DNASTar.

## RESULTADOS

### 1. Análise de amostras de água e dos dialisados

Os resultados das análises das três coletas estão apresentadas na Tabela 1. Quanto à pesquisa de *Pseudomonas*, as amostras A1, A2 e A3 foram negativas e na segunda coleta (A4 a A13), 80% das amostras revelaram a presença da bactéria, assim como as cinco amostras (A14 a A18) da terceira coleta evidenciaram *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*).

### 2. Hemoculturas

De quatro pacientes foram isoladas *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3. Caracterização fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

As cepas isoladas de sangue pertenciam ao sorotipo O15 e ao piocinotipo P10, acrescida de uma cepa isolada de água que também pertencia ao sorotipo O15 e piocinotipo P10. Quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, dessas cinco cepas, observou-se o mesmo padrão de resistência (Tabela 2).

**Tabela 1.** Resultados das análises de amostras de água coletadas no período 23 de Setembro a 1º de Outubro de 1996, dos diferentes pontos do sistema de hemodiálise

Amostra	Ponto de coleta	Pesquisa			
		CPP(1)	Bolores e leveduras	Coliformes totais	<i>Pseudomonas</i> spp
A1	Poço	< 30UFC(2)	< 10 UFC	Ausente	Ausente
A2	Rede Municipal	< 30 UFC	< 10 UFC	Ausente	Ausente
A3	Reservatório (água do poço+água da rede)	< 30 UFC	< 10 UFC	Ausente	Ausente
A4	Máquina 1 <sup>(3)</sup>	2.8.10 <sup>2</sup> UFC	< 10 UFC	3 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A5	Máquina 2	> 3.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	>300 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A6	Maquina 3	1.1.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	18 UFC	Ausente
A7	Maquina 4	> 3.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	Ausente	<i>P.aeruginosa</i>
A8	Máquina 5	> 3.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	>300 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A9	Máquina 6	2.1.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	>300 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A10	Máquina 7	2.2.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	>300 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A11	Máquina 8	7.1.10 <sup>2</sup> UFC	< 10 UFC	>300 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A12	Máquina 9	2.0.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	>300 UFC	<i>P.aeruginosa</i>
A13	Máquina 10	3.2.10 <sup>2</sup> UFC	< 10 UFC	132 UFC	Ausente
A14	Saída do reservatório de água tratada	> 3.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	15 UFC	<i>B.cepacia</i>
A15	Antes da entrada da máquina 5	> 3.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	Ausente	<i>B.cepacia</i>
A16	Antes da entrada da máquina 10	> 3.10 <sup>3</sup> UFC	< 10 UFC	Ausente	<i>B.cepacia</i>
A17	Cápsula do filtro da máquina 5	-( <sup>4</sup> )	-	-	<i>B.cepacia</i>
A18	Cápsula do filtro da da máquina 10	-	-	-	<i>P.aeruginosa</i>

<sup>(1)</sup>CPP, contagem padrão em placa; UFC/mL <sup>(2)</sup>unidade formadora de colônia/mL; <sup>(3)</sup>as amostras coletadas correspondem ao dialisado das máquinas; <sup>(4)</sup>testes não realizados



#### 4. Ribotipagem

As cinco cepas de *P.aeruginosa* com as mesmas características fenotípicas apresentaram um padrão único de bandas quando as amostras de DNA foram clivadas com a enzima *EcoRI*. A identidade genética destas cepas foi confirmada com a utilização de uma segunda enzima, *BamHI* (Figura 1) e os resultados completos de todos os ensaios realizados foram lançados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características fenotípicas e genotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue e de amostras de água coletadas de diferentes pontos do sistema de hemodiálise

Material	Sorotipos	Piocinotipo	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Ribotipo
Sangue	O15	P10	AP,CF,CL,CO,CX,TT	E1B1
Sangue	O15	P10	AP,CF,CL,CO,CX,TT	E1B1
Sangue	O15	P10	AP,CF,CL,CO,CX,TT	E1B1
Sangue	O15	P10	AP,CF,CL,CO,CX,TT	E1B1
Água- Amostra A4	O7,8	-*		-
Água- Amostra A5	O15	P10	AP,CF,CL,CO,CX,TT	E1B1
Água- Amostra A7	O10	-		-
Água- Amostra A8	O4	-		-
Água- Amostra A9	O10	-		-
Água-Amostra A10	O11	-		-
Água-Amostra A18	O7,8	-		-

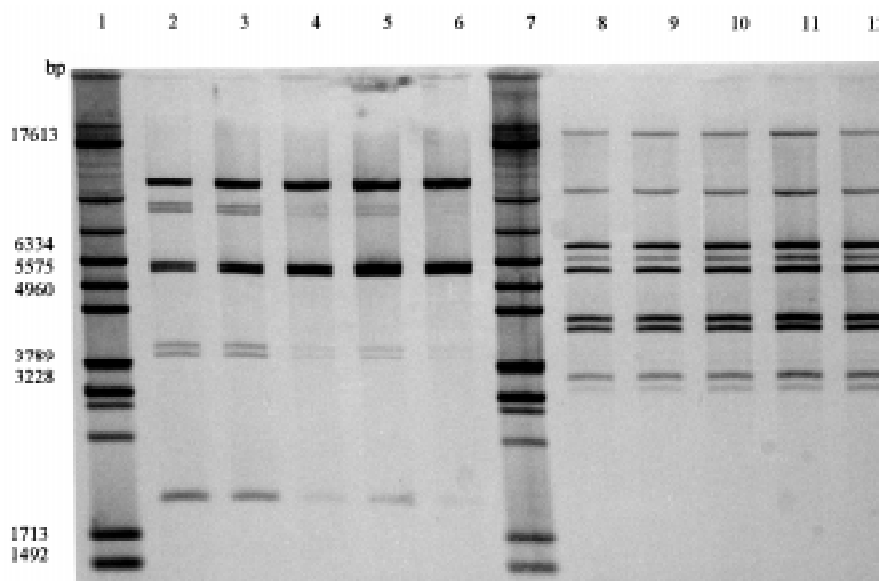
\*A determinação do piocinotipo e do padrão de resistência e a ribotipagem foram realizadas somente nas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao sorotipo O15. AP, ampicilina; CF, cefalotina; CL, cloranfenicol; CO, cefoxitina; CX, cefalexina; TT, tetraciclina

#### DISCUSSÃO

Os microrganismos frequentemente associados à contaminação de dialisados e água utilizada no preparo de fluidos de diálise e na desinfecção das máquinas de hemodiálise são os bacilos Gram negativos, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas spp*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>5,12,24</sup>.

Espécies do gênero *Pseudomonas* estão amplamente disseminadas na natureza (sistemas aquáticos doce e marinho, superfícies de vegetais e solo), facilitada pela sua extraordinária versatilidade fisiológica, podendo se multiplicar mesmo em água destilada<sup>10,11,17,30</sup>.

A rápida multiplicação destes microrganismos nos dialisados é favorecida pela presença de elementos químicos do sangue dos pacientes que passam para os dialisados durante o processo de hemodiálise. Concentrações bacterianas semelhantes às obtidas em meios de cultura podem ser observadas nos dialisados, representando um risco potencial para pacientes de outras unidades<sup>11,12</sup>. *Pseudomonas aeruginosa*, reconhecida como um dos mais importantes agentes etiológicos de infecções nosocomiais<sup>4,21</sup>, propaga-se com facilidade para outros pacientes imunocomprometidos de diferentes unidades do mesmo hospital, além de disseminar a resistência às drogas<sup>12</sup>. Por esta razão, a “Association for the Advancement of Medical Instrumentation” (AAMI)<sup>2</sup> recomenda que a contagem bacteriana não deve exceder 2.000 UFC/mL. Por outro lado, recomenda-se que a contagem bacteriana não deve ser superior a 200 UFC/mL na água utilizada no preparo de soluções germicidas



**Figura 1.** Ribotipo de cepas *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue e de água, obtido após digestão do DNA com *EcoRI* (2-6) e *BamHI* (8-12). O marcador de peso molecular (DNA de *H.aegyptius* 3031 digerido com *EcoRI*) está mostrado em 1 e 7. O perfil de cepas isoladas de sangue correspondem a 2-5 e 8-11, e da cepa isolada da água está mostrado em 6 e 12

para a desinfecção de dializadores, assim como na água tratada utilizada na preparação de solução de diálise e fluidos de diálise e ainda na água utilizada para lavar os dializadores<sup>2,3</sup>.

Pela inexistência de uma legislação específica vigente no país, os resultados obtidos nas análises das amostras de água e dos dialisados da unidade onde ocorreu o surto de bacteriemia foram comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Farmacopéia Britânica<sup>7</sup>, que recomenda que a contagem bacteriana não deva exceder a  $10^2$  microrganismos/ml. Somente em 11 de outubro de 1996, entrou em vigor a Portaria 2042 do Ministério da Saúde, atualmente substituída pela Portaria 82/2.000 de 03 de janeiro de 2000 que estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços e as normas para cadastramento destes serviços ao Sistema Único de Saúde<sup>25</sup>.

A alta contagem de bactérias nos dialisados de todas as máquinas, excedendo o limite recomendado pela Farmacopéia Britânica<sup>7</sup>, demonstra que aquele centro estava processando as hemodíalises em condições totalmente inadequadas. Segundo Favero et al.<sup>11</sup>, fatores que podem estar associados à contaminação microbiana dos fluidos utilizados em máquinas de hemodiálise são os métodos de tratamento e distribuição de água e tipos de sistemas de diálise.

Os casos de bacteriemia ocorridos neste surto tiveram uma fonte única de contaminação, como ficou demonstrado pela caracterização das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue. Os marcadores fenotípicos como o sorotipo, piocinotipo e o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos sugerem uma origem comum para estas cepas. A utilização da ribotipagem, técnica amplamente utilizada em estudos epidemiológicos de surtos de infecções por *Pseudomonas* spp<sup>6,16,18,28</sup>, demonstra a identidade genética das cepas isoladas dos quatro pacientes com bacteriemia. É

interessante observar que uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* com as mesmas características fenotípicas e genotípicas também foi isolada do dialisado da máquina 2 (Amostra A5), coletada nove dias após a coleta de sangue dos pacientes. Durante a coleta de dialisados, as máquinas não estavam em funcionamento e haviam sido formolizadas três dias antes da coleta.

Bacilos Gram negativos, particularmente aqueles designados como bactérias da água como as espécies do gênero *Pseudomonas*, embora sejam os mais frequentes, não são os únicos que representam riscos aos pacientes renais crônicos. Bactérias do gênero *Mycobacterium* ("não tuberculosas") também são frequentes em águas de hemodiálise, responsabilizadas inclusive por um surto de bacteriemia ocorrido na Califórnia, EUA<sup>9,23</sup>.

Manter um nível baixo de contaminação bacteriana na água que abastece o sistema de hemodiálise pode representar uma maneira de prevenir os riscos aos pacientes. Segundo Gordon et al.<sup>15</sup>, a obtenção de resultados satisfatórios depende da rigorosa e sistemática adoção das recomendações tais como a análise rotineira (mensal) de água tratada utilizada nos processos de hemodiálise, estabelecimento de um sistema de vigilância ativa para reações adversas em pacientes submetidos à hemodiálise, controle rotineiro das membranas de diálise e desinfecção mensal do sistema de distribuição da água.

A frequente ocorrência de surtos, alguns de extrema gravidade, levando inúmeros pacientes a óbito, mostra a importância do cumprimento da Portaria 82/2000 do Ministério da Saúde que estabelece os procedimentos que asseguram a qualidade da água empregada em todas as etapas do processo de diálise, a monitorização dos parâmetros microbiológicos, bem como os procedimentos de tratamento da água.

RIALA6/883

Pisani, B. et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a Hemodialysis Center, Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):51-56, 2000

**ABSTRACT.** Between September 11 and 20, 1996, an outbreak of bacteremia occurred in patients undergoing hemodialysis at one dialysis center in Campinas, São Paulo, Brazil. Water and dialysate samples as well as blood samples from patients with bacteremia were collected for bacteriological analysis. All *Pseudomonas aeruginosa* strains were serotyped and pyocin-typed. *P. aeruginosa* strains belonging to the same serotype (O15) and pyocin type (P10) were submitted to antimicrobial susceptibility testing and to ribotyping using two restriction enzymes, *EcoRI* and *BamHI*. The high concentrations of bacteria detected in all hemodialyzers and their heavy rate of contamination (86.7%) by *Pseudomonas aeruginosa* or *Burkholderia cepacia* showed that this dialysis center was operating in inadequate conditions. One strain of *P. aeruginosa* isolated from hemodialyzer and the strains recovered from blood cultures of patients showed similar phenotypical and genetic traits which suggest a common source of infection in this outbreak. We report the potential risk for patients undergoing hemodialysis to acquire infections due to the inadequate practice of reusing disposable dialyzers during the reprocessing procedures.

**KEY WORDS.** Hemodialysis; bacteremia; *Pseudomonas aeruginosa*; serotyping; pyocintyping; ribotyping.

## REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19<sup>th</sup> ed. Washington: APHA; 1995. p. 9-31 r 9-53.
2. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American national standard for hemodialysis systems. In: **AAMI Standards and Recommended Practices**. Volume 3: Dialysis. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 1990. P. 27-58.
3. Arduino, M.J. et al. Comparison of microbiologic assay methods for hemodialysis fluids. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 592-594, 1991.
4. Bodey, G.P. et al. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Infect. Dis.**, 5: 279-313, 1983.
5. Beck-Sague, C.M. et al. Outbreak of Gram-negative bacteremia and pyrogenic reactions in a hemodialysis center. **Am. J. Nephrol.**, 10: 397-403, 1990.
6. Blanc, D.S. et al. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: Discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 71-77, 1993.
7. **British Pharmacopœia**. London: International Edition; 1993. p. 935-936.
8. Brenner, D.J. et al. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. **J. Clin. Microbiol.**, 15: 1133-1146, 1982.
9. Carson, L.A. et al. Prevalence of nontuberculous *Mycobacteria* in water supplies of hemodialysis centers. **Appl. Microbiol.**, 54: 3122-3125, 1988.
10. Costerton, J.W. The etiology persistence of cryptic bacterial infections: A hypothesis. **Rev. Infect. Dis.**, 6: S608- S616, 1984.
11. Favero, M.S. et al. Factors that influence microbial contamination of fluids associated with hemodialysis machines. **Appl. Microbiol.**, 28: 882-830, 1974.
12. Favero, M.S. et al. Microbial contamination of renal dialysis systems and associated health risks. **Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs.**, 20: 175-183, 1974.
13. Favero, M.S. Health hazards associated with high levels of gram-negative bacteria in hemodialysis systems. In: **AAMI Standards and Recommended Practices**. Volume 3: Dialysis. Arlington: VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 1990. P. 81-101.
14. Fyfe, J.M.; Harris, G.; Govan, J.R.W. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, 20: 47-50, 1984.
15. Gordon, S.M. et al. Pyrogenic reactions associated with the reuse of disposable hollow-fiber hemodialysers. **J. Amer. Med. Ass.** 260: 2077-2081, 1988.
16. Grattard, F. et al. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains by ribotyping: high discriminatory power by using a single restriction endonuclease. **J. Med. Microbiol.**, 40: 275-281, 1994.
17. Grundmann, H. et al. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. **J. Infect. Dis.**, 168: 943-947, 1993.
18. Gruner, E. et al. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical intensive care patients. **J. Infect. Dis.**, 167:1216-1220, 1993.
19. Instituto Adolfo Lutz. **Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 1982. P. 533.
20. Kidd, E.E. Bacterial contamination of dialysis fluid of artificial kidney. **Brit. Med. J.**, 1: 880-882, 1964.
21. Kuikka, A.; Valtonen, V.V. Factors associated with improved outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a Finnish University Hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 17: 701-708, 1998.
22. Lanyi, B.; Bergan, T. Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods Microbiol.**, 10: 93-168, 1978.
23. Lowry, P.W. et al. *Mycobacterium chelonae* infection among patients receiving high-flux dialysis in a hemodialysis clinic in California. **J. Infect. Dis.**, 161: 85-90, 1990.
24. Maki, D.G. Nosocomial bacteremia. An epidemiological overview. **Am. J. Med.**, 70:719-732, 1981.
25. Ministério da Saúde – Portaria MS – GM 82/2.000 de 03 de Janeiro de 2.000 – **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 de Fevereiro de 2.000 – Seção 1, p.13-16
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 6.ed.. Villanova: Approved Standard. M2-A6; 1997.
27. Palleroni, N.J. Genus I – *Pseudomonas*. In: **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins; 1986. p. 141-199.
28. Picard, B. et al. Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment-length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. **J. Med. Microbiol.**, 40: 313-322, 1994.
29. Popovic, T.; Bopp, C.A.; Wachsmuth, K. Epidemiological application of a standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2474-2482, 1993.
30. Romling, U. et al. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 1734-1738, 1994.

Recebido em 12/05/2000; Aprovado em 29/12/2000

## Características de virulência e análise clonal de amostras de *Escherichia coli* dos sorogrupos O142, O127 e O86

Ghilardi, Â.C.R. Características de virulência e análise clonal de amostras de *Escherichia coli* dos sorogrupos O142, O127 e O86. São Paulo, 1999. [Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].

A espécie *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, corresponde a um bacilo Gram-negativo, que compõe predominantemente a flora anaeróbia facultativa normal do intestino humano, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal.

De acordo com o esquema proposto por Kauffmann, em 1947, os membros dessa espécie podem ser diferenciados com base no antígeno somático (O) no antígeno flagelar (H) e no antígeno capsular (K) em sorogrupos e sorotipos. As *E. coli* também podem ser divididas em clones, através de técnicas como "Multilocus Enzyme Electrophoresis" (MLEE) e polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP). As infecções humanas causadas pelos diferentes sorotipos de *E. coli* podem ser classificadas em extra-intestinais e intestinais. As cepas de *E. coli* causadoras de diarreia no homem são denominadas *E. coli* diarreogênicas e para identificação destes microrganismos é necessário que sejam diferenciados de cepas de *E. coli* da flora normal. Apesar da existência de uma correlação muito próxima entre categorias diarreogênicas e sorotipos,

Foram analisadas 192 cepas de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos O142, O127 e O86 quanto às características genotípicas e fenotípicas relacionadas a fatores de virulência. Através da identificação dos antígenos flagelares (H) verificou-se uma grande diversidade de sorotipos nos três sorogrupos estudados, sendo que os mais frequentemente encontrados foram: O142:H34, O127:H21, O127:H40 e O86:H34.

As propriedades de virulência foram pesquisadas utilizando testes que incluíram adesão à monocamada de célula HeLa, e hibridação com as sondas genéticas específicas para as principais categorias de *E. coli* diarreogênicas. Nenhuma das 192 cepas testadas reagiu com as sondas *daac*, *Stx 1 e 2*, *LT-1 e 2*, *ST-I h e p* e *INV*.

A categoria predominante nos três sorogrupos foi EPEC, representada por cepas que albergavam o plasmídeo EAF (EPEC Adherence Factor), o gene cromossômico *eae* e apresentavam o padrão de adesão localizada. Foram também detectadas algumas cepas pertencentes à categoria EAEC nos sorogrupos O127 e O86, que caracterizaram-se pela reatividade

estes não são contudo uma característica suficiente para identificar uma cepa diarreogênica.

Atualmente, a detecção de *E. coli* diarreogênica baseia-se também na identificação de características fenotípicas e genotípicas, as quais definem as diferentes categorias de virulência destes organismos. As *E. coli* associadas à infecção intestinal pertencem às seguintes categorias: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC).

As EPEC constituem uma das mais importantes causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento. No Brasil, 30% dos casos de diarreia infantil, que acometem crianças de baixo nível socioeconômico, são causados por EPEC. Os sorogrupos O142, O127 e O86, que pertencem a esta categoria, são de grande importância epidemiológica em nosso meio, como agentes causais de diarreia, e não tendo ainda sido estudados, enfatizamos a relevância deste trabalho.

de com a sonda EAEC e por apresentarem padrão de adesão agregativa.

Através da ribotipagem foram detectados 14 ribotipos distintos entre os três sorogrupos estudados. Foi também observada uma correlação entre ribotipos e sorotipos, principalmente nos sorogrupos O142 e O86. Três grupos clonais foram determinados pela ribotipagem das cepas estudadas e observou-se uma associação entre ribotipo, clone e características de virulência.

Os resultados obtidos neste trabalho são de grande importância para o estudo das diarreias, pois com esses relatos finalizamos um importante projeto que teve como objetivo a caracterização dos sorogrupos de EPEC (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158). O conjunto destes resultados demonstrou que estes sorogrupos são bastante heterogêneos com relação aos mecanismos de virulência, uma vez que eles podem apresentar as características de virulência de qualquer uma das categorias de *E. coli* diarreogênicas descritas.

## Avaliação da resposta imune e da excreção viral em crianças vacinadas contra o sarampo

Vaz de Lima, L.R.A. **Avaliação da resposta imune e da excreção viral em crianças vacinadas contra o sarampo.** São Paulo, 1999. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].

O sarampo continua causando epidemias em várias partes do mundo envolvendo principalmente populações vacinadas, renovando assim o interesse em estudos sobre vacinação. Neste estudo, amostras seriadas (0, 1, 3, 6, 9, 15, 30, 60 dias) de sangue, saliva e urina foram obtidas de 45 crianças de 9 e 15 meses de idade, após as duas vacinações contra o sarampo. Avaliou-se a resposta imune humoral e a cinética da excreção viral, utilizando-se as técnicas de ELISA, neutralização por redução de placas, “immunoblotting” e reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

Os resultados obtidos mostraram uma correlação entre a reações de ELISA IgG e IgM e a reação de neutralização por redução de placas. A presença de anticorpos neutralizantes protetores foi confirmada pela detecção de anticorpos anti-hemaglutinina e nucleoproteína por “immunoblotting”, sugerindo três perfis de resposta vacinal. As crianças foram considera-

das bons, médios e maus respondedores. Com base nesses perfis, estabeleceu-se uma correlação entre a resposta imune e a excreção viral.

Foi observado baixo nível de anticorpos neutralizantes no soro pré-imunização das crianças estudadas aos 9 meses de idade. Foi encontrado falha vacinal primária, após a aplicação da vacina monovalente, evidenciando a necessidade da segunda dose, para obtenção de melhores títulos de anticorpos protetores.

O RNA viral foi detectado após períodos longos depois da vacinação, principalmente em células mononucleares (linfócitos). Foi demonstrado que a saliva foi o espécime clínico de maior positividade na detecção do RNA viral excretado pós-vacinação.

\*Tese disponível na biblioteca do IAL

## Vacinação de camundongos Balb/c com o gene da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*: estudo da resposta imune

Pinto, A.R. **Vacinação de camundongos Balb/c com o gene da gp43 de *Paracoccidioides Brasiliensis*: estudo da resposta imune.** São Paulo, 2000. [Tese de Doutorado – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal Paulista].

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que causa paracoccidioidomicose (PCM), uma doença que afeta geralmente trabalhadores rurais, mas que também pode chegar até grandes centros urbanos através da migração de indivíduos infectados. É encontrada na América Latina, sendo a micose profunda mais prevalente nesta região. O uso de vacinas na prevenção de doenças infecciosas têm sido utilizado com bastante sucesso contra infecções causadas por vírus e bactérias, porém não foi ainda eficazmente utilizado na prevenção de doenças fúngicas. Dentre as diversas maneiras de se produzir vacinas, nos últimos anos foi desenvolvido uma metodologia que utiliza seqüências de DNA, o que se convencionou chamar de vacinas genéticas. Esta terceira geração de vacinas têm sido utilizada em ensaios de imunoproteção contra infecções virais, bacterianas e parasitárias, e o objetivo deste trabalho foi buscar o desenvolvimento de uma vacina genética contra a PCM.

Resultados prévios mostraram que a imunização com a gp43 nativa ou com um peptídeo de 15 aminoácidos (P10) contido neste antígeno protegeu camundongos contra o desafio de leveduras virulentas de *P. brasiliensis*. Para determinar se similar imunidade protetora poderia ser conseguida pela imunização com DNA, o cDNA da gp43 foi subclonado em um vetor de expressão para células de mamíferos denominado VR-1012 (Vical Inc.), criando assim o vetor VR-gp43. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com 100µg de VR-

gp43 ou VR-1012, num total de 4 doses, com intervalos de 2 semanas, por 2 meses. A resposta humoral contra a gp43 aumentou durante a imunização com VR-gp43, sendo IgG1, IgG2a e IgG2b os principais isótipos produzidos. Resposta imune celular também foi induzida, como medido pela estimulação *in vitro* com gp43 de células de linfonodos dos animais imunizados com VR-gp43, com alta produção de IL-2 e  $\gamma$ -INF. Estes resultados sugerem que uma resposta imune celular mista TH1/TH2, modulada por  $\gamma$ -INF, foi induzida pela imunização com DNA neste modelo murino. A imunidade induzida foi duradoura e capaz de proteger camundongos BALB/c infectados com leveduras virulentas de *P. brasiliensis*, levando à significativa diminuição do número de leveduras nos pulmões e redução ou não disseminação para baço e fígado dos camundongos, quando comparado com os animais controles.

Estes resultados indicam que a imunização de camundongos BALB/c com um vetor de expressão que carrega o gene da gp43 do *P. brasiliensis* sob o controle do promotor do citomegalovírus induz imunidade humoral e celular específicas contra o produto traduzido deste gene, e que esta imunidade é protetora contra o desafio intratraqueal de leveduras virulentas do fungo. Este trabalho mostra ainda que a imunização gênica é uma alternativa viável para induzir imunidade protetora também contra infecções fúngicas, sendo um dos primeiros relatos feitos nessa área.

## Doença meningocócica: estudo epidemiológico comparativo em nível mundial, período 1887-1997.

Requejo, H.I.Z. **Doença meningocócica: estudo epidemiológico comparativo em nível mundial, período 1887-1997.** São Paulo, 1999. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

Estudou-se comparativamente, no período 1887-1997, o comportamento da doença meningocócica na Europa, Américas, África, Ásia e Oceania, no que se refere a distribuição geográfica, incidência e letalidade, cepas de meningococos predominantes e fatores predisponentes. Como fonte de dados foram utilizados os diversos boletins epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde, da Organização Pan-Americana de Saúde e de órgãos governamentais de saúde de vários países, bem como artigos pertinentes à doença meningocócica publicados em livros e periódicos nacionais e internacionais. Os dados relativos a casos e óbitos notificados foram agrupados em períodos: 1887 a 1913; 1914 a 1918 (Primeira Guerra Mundial); 1919 a 1928; 1929 a 1938 (Depressão Econômica Mundial); 1939 a 1945 (Segunda Guerra Mundial); 1946 a 1949 (período imediatamente pós-guerra) e as décadas de 1950 a 1990. Para a Oceania somente há dados disponíveis a partir de 1915. Foram calculados os coeficientes

região, à baixa condição sócio-econômica da população e a deficiência de atuação profilática.

- letalidade:

Desde o começo do século XX tem ocorrido uma queda da letalidade pela doença meningocócica, porém de modo não uniforme em todos os países e continentes. A queda dos coeficientes de letalidade apresenta-se ligada ao desenvolvimento dos métodos curativos e às condições sócio-econômicas de cada país ou estado, bem como à disponibilidade das medidas terapêuticas e profiláticas e à qualidade da atenção aos pacientes por parte do corpo clínico-hospitalar.

- meningococos predominantes:

Os dados disponíveis de sorogrupagem mostram na Europa o predomínio do sorogrupo B durante a Primeira Guerra Mundial e do sorogrupo A na Segunda Guerra Mundial. Na Ásia e na África o sorogrupo A sempre foi predominante e nas Américas e Oceania, os meningococos B e C. Após o período de guerra, durante a década de 1950 foi implementado o uso profilático das sulfonamidas, o que levou ao surgimento, em todo o mundo, de cepas de meningococo sulfonâmica-resistentes. A partir dos anos 1980, quando se introduziu a soro/subtipagem, tem-se verificado que no sorogrupo A os fenótipos A:4:21:P1.9 e A:4:P1.7 predominam na África e Ásia enquanto que nos sorogrupos B e C os fenótipos B:4:P1.4, B:4:P1.15,

anuais de incidência (casos/100.000 hab/ano) e de letalidade (%), usando para os primeiros os dados populacionais disponíveis no Demographic Yearbook (ONU). Para o Brasil, foram usados os dados populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

O presente estudo mostrou as seguintes conclusões em relação a:

- morbidade:

A doença meningocócica tem se manifestado em todos os continentes, sob a forma endêmica com uma elevação sazonal da morbidade durante o inverno até meados da primavera. A forma epidêmica mostrou-se associada a épocas de convulsões sociais (guerras, depressão econômica) e às mobilizações populacionais. No cinturão africano das meningites a doença é hiperendêmica, ocorrendo temporariamente longos períodos epidêmicos atribuídos a condições climáticas favoráveis da

B;15:P1.7,16; C:2a:P1.2,5; C:2b:P1.2,5 e C:2b:P1.3 são os mais comuns nas Américas, Europa e Oceania.

- fatores predisponentes:

Em nível de indivíduos, a queda da imunidade decorrente de subnutrição, doenças respiratórias e/ou degenerativas e uso indiscriminado de tabaco e/ou bebidas alcoólicas, assim como as condições inadequadas de aglomeração habitacional, atuam como fatores que predis põem os indivíduos à doença meningocócica.

Em nível coletivo, as guerras, a depressão econômica e os movimentos populacionais com conseqüente estresse social, bem como a variação climática, provocam um aumento dos coeficientes de morbidade e ocasionais epidemias.

Em conclusão, esta pesquisa, acerca de dois séculos de história e epidemiologia, mostra que a doença meningocócica em sua forma extensa, sempre esteve associada com os períodos de convulsão social e com os movimentos populacionais. Mesmo que no futuro seja produzida uma vacina anti-meningocócica polivalente, capaz de proteger o homem contra todas as cepas de meningococo, o efetivo controle dessa doença dependerá do acesso de todos os povos a essa vacina e à estabilidade sócio-econômica em nível mundial.

\*Tese disponível na biblioteca do IAL

## Comparação dos achados histopatológicos e de ploidia em neoplasia intraepitelial cervical: um tema de impacto em Saúde Pública

Shirata, N.K. **Comparação dos achados histopatológicos e de ploidia em neoplasia intraepitelial cervical: um tema de impacto em Saúde Pública.** São Paulo 1999. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

Foi utilizada a citometria por imagem para determinar o conteúdo de DNA ("ploidia") em cortes histológicos de colo uterino submetidas à reação de Feulgen (tionina), segundo diagnóstico histopatológico de cervicite crônica, NIC 1, NIC 2 e NIC 3. O estudo da concordância inter-observadores no diagnóstico histológico das biópsias de colo uterino, segundo a classificação histológica proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foi efetuado visando sua validação como padrão-ouro para as comparações com a análise do conteúdo de DNA. Para a análise estatística foi adotada o teste de Qui-quadrado ou razão da verossimilhança para avaliação dos resultados das variáveis classificatórias (cervicite crônica, NIC 1, NIC 2 e NIC 3). O coeficiente kappa foi utilizado para verificar a concordância absoluta entre os resultados das biópsias entre os dois observadores. Das 82 biópsias estudadas houve concor-

dância absoluta em 62,2% dos casos e 37,8% com discordância de apenas 1 grau na primeira leitura. Quando confrontados com o diagnóstico de consenso, observamos uma discordância superior a um grau em apenas dois casos (2,44%). Em relação à ploidia, os aneuplóides foram observados em 86,2% casos de NIC 3; 58,8% NIC 2; 25,8% NIC 1. Os diplóides em 100% de casos de cervicite crônica; 74,2% NIC 1; 41,2% NIC 2 e 13,8% NIC3. Concluímos neste estudo que aneuploidia está intimamente ligada às lesões de alto grau e, que lesões de baixo grau com comportamento biológico aneuplóide devem ter um seguimento mais rigoroso das pacientes. A subdivisão histológica de três graus, além de validar a morfologia, demonstrou ser útil na discriminação da característica biológica do DNA genômico.

\* Tese disponível na biblioteca da IAL





## Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, período de 1996-1997

Taniguchi, H.H. Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, período de 1996-1997. São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

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 algumas observações em áreas rural e periurbana do município de Eldorado, Região do Vale do Ribeira, SP.

Realizou-se coletas de flebotomíneos em ecótopos artificiais, com porcos, galinhas, cães, hamsters, roedores silvestres e marsupiais, construídos em ambiente aberto com intensa ação antrópica, na margem e em interior de mata, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 1997.

Foram coletados 2.812 exemplares de 10 espécies. *Lutzomyia ayrozai* prevaleceu em ambiente de mata pouco alterado e *L. intermedia s.l.* predominou nos ambientes com intensa ação antrópica, reforçando seu papel de vetor de leishmaniose tegumentar naquela região.

atividade, sobretudo na primavera e outono. No inverno, as coletas foram positivas até as 5:00 horas. No verão, o início das coletas ocorreu por volta das 21:00 h.

A presença de diferentes iscas animais não interferiu na diversidade das espécies de flebotomíneos. Observou-se que o nível de alteração ambiental atuou como pressão decisiva

A presença marcante de *L. ayrozai*, no ambiente florestal, restrita ao ambiente não alterado pela ação antrópica, confere a esta espécie condições potenciais para o papel de vetor na hipótese da existência de ciclos silvestres de circulação de *Leishmania* nesta região, tendo roedores silvestres como possíveis mantenedores vertebrados do parasita.

*L. ayrozai* apresentou maior atividade entre abril e julho enquanto *L. intermedia s.l.*, em ambiente aberto e alterado foi mais abundante entre maio e outubro e, em margem de mata entre março e junho.

Para análise de observações do ritmo horário foram utilizados os dados obtidos no período de outubro/89 a setembro/90, permitindo-se comparar as populações daquela época e da atual.

A primeira metade da noite revelou ser a de maior

na sucessão biológica da composição da fauna flebotomínica, evidenciando a dificuldade de *L. fischeri*, *L. migonei*, *L. ayrozai* transporem as barreiras impostas pela ação humana. *L. intermedia s.l.* adaptou-se de tal maneira que, atualmente, constitui-se na única espécie a colonizar este ambiente no Vale do Ribeira.

## Estudo comparativo de duas metodologias de xenodiagnóstico artificial, aplicadas simultaneamente em pacientes chagásicos crônicos, residentes na cidade de São Paulo, Brasil.

Almeida, T.T.C. **Estudo comparativo de duas metodologias de xenodiagnóstico artificial, aplicadas simultaneamente em pacientes chagásicos crônicos, residentes na cidade de São Paulo, Brasil.** São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

Este trabalho teve como objetivo comparar as metodologias de xenodiagnóstico *in vitro*, empregadas nos exames de rotina do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e da Universidade Federal de Goiás (UFG), com modificações. Examinou-se sangue de 61 pacientes chagásicos crônicos, triados por sorologia anti-*T. cruzi*, entre candidatos a doadores, em banco de sangue, do Hospital das Clínicas da FMUSP, sem nenhum tratamento anterior para doença de Chagas. Dos 41 (67,2%) homens e 20 (32,8%) mulheres, 26 (42,6%) pacientes pertenciam à faixa etária de 43-52 anos e 15 (24,6%) à de 33-42 anos. Embora nascidos em diferentes áreas endêmicas, todos os indivíduos já residem na cidade de São Paulo há muitos anos. Para cada uma das metodologias testadas, utilizou-se 40 ninfas de 3º e 4º estágio de *Triatoma infestans*, com jejum prévio de duas a três semanas. De cada paciente foram colhidas duas amostras sanguíneas de aproximadamente 10 ml cada, em tubos a vácuo, heparinizados. O sangue era aquecido em banho-maria, à 38°C por 15 minutos, em frasco de Borrel (técnica do IAL) ou no próprio tubo, sendo depois transferido para um recipiente de vidro, de câmara dupla, com água à 45°C na parte

externa (técnica modificada da UFG). Em torno dos 30 e 60 dias, as ninfas eram colocadas em *pools* de quatro, dentro de um pequeno recipiente transparente e alimentadas, para realização da coproscopia, pelo método das dejeções espontâneas (metodologia UFG). Nos *pools* em que a dejeção era insuficiente, fazia-se o método da compressão abdominal, como o que foi realizado com as ninfas da metodologia IAL, as quais não receberam alimentação suplementar. Dos 61 xenodiagnósticos, 21 (34,42%) foram positivos para *Trypanosoma cruzi*, sendo 18 (29,5%) xenopositivos na metodologia modificada da UFG, contra 7 (11,47%) na do IAL. Desses, 13 (61,9%) eram pacientes com idades entre 43 e 52 anos. A diferença entre os dois métodos é estatisticamente significativa, ao nível de 0,05. Estes resultados nos levam a supor que pequenas modificações, como o aumento da superfície de contato entre o recipiente contendo o sangue, mantido aquecido e o frasco com as ninfas, aumentariam a sensibilidade da técnica de xenodiagnóstico, atualmente em uso no IAL.

\*Tese disponível na biblioteca do IAL

## Estudo crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis*.

Martins, M.C. Estudo crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis*. São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

O exame microscópico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar é um componente essencial do Programa de Controle da Tuberculose. A cultura é necessária para a detecção semanas para o fornecimento do resultado da cultura. A realização do teste de sensibilidade às drogas ou a identificação das demais espécies do gênero aumenta esse tempo em duas semanas. Atualmente com os novos sistemas bacteriológicos, a detecção do crescimento é em geral em torno de duas semanas e no caso de espécimes biológicos com baciloscopia negativa o tempo pode ser mais longo. Diversos testes de amplificação e detecção de DNA ou rRNA do complexo *M. tuberculosis* têm sido propostos para o diagnóstico rápido da tuberculose (alguns disponíveis comercialmente). Os estudos para verificação da validade desses testes são efetuados em comparação com a cultura e ou o diagnóstico clínico do paciente. A revisão sistemática de diversos estudos possibilita a comparação de um grande número de amostras com interpretação estatística dos dados e pode ser usada para resolver incertezas quando os trabalhos publicados apresentam dados discordantes. Foram identificados 81 trabalhos, publicados no período de janeiro de 1991 a dezembro de 1998, que adotaram as técnicas de

das formas paucibacilares da tuberculose pulmonar (pacientes imunodeprimidos ou crianças) e das formas extrapulmonares. Com os métodos tradicionais são necessárias em torno de oito amplificação de ácidos nucleicos incluídas neste estudo que foram: a reação em cadeia da polimerase – o PCR (não comercial) IS6110 e o teste AMPLICOR® – e a amplificação mediada pela transcrição – o teste AMTD®. A média dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo e acurácia foi calculada quando a comparação do teste de amplificação de ácidos nucleicos foi efetuada com a cultura e o diagnóstico clínico. O programa MedCalc® foi utilizado para delinear a curva ROC “receiver operating characteristic” dos testes AMTD® e AMPLICOR® usando os valores verdadeiros positivos e falsos positivos obtidos nos estudos comparativos com esses testes. Os valores abaixo da curva ROC para esses testes comparados com a cultura foram: 0,859 e 0,826, respectivamente. Quando os mesmos foram comparados com a cultura e ou o diagnóstico clínico os valores foram: 0,947 e 0,970, respectivamente. Os valores obtidos são próximos de 1,0, ou seja, o poder discriminatório dos testes para o diagnóstico da tuberculose é quase perfeito.

## **AGRADECIMENTOS AOS RELATORES**

A comissão de redação agradece aos colaboradores deste volume.

- Cristiane B. Cano  
I.A.L. – Central – Bromatologia e Química
- Mário Tavares  
I.A.L. – Central – Bromatologia e Química
- Eide Dias Camargo  
I.A.L. – Central – Biologia Médica
- Therezinha Jesus Andreoli Pinto  
USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- Osmar Malaspina  
UNESP/Rio Claro
- Eliana Roxo  
Instituto Biológico
- Tania Gomes  
Escola Paulista de Medicina
- Lúcia Baldocci  
Instituto Biológico
- Célia Sylos  
UNESP/Araraquara
- Elizabeth W. de Menezes  
USP/Faculdade de Ciências Farmacêutica
- Rogério Perujo Tocchini  
Instituto Tecnológico de Alimentos
- Heloisa Mascia Cecchi  
Faculdade Engenharia de Alimentos/Unicamp
- Ligia B. de Almeida Muradian  
USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- Heitor Franco de Andrade Júnior  
Instituto de Medicina Tropical - SP

# BOLETIM do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Bol. Inst. Adolfo Lutz, ano 10, n. 1-3, p. 1-26, 2000

## Expediente

**Dr. Cristiano Corrêa A. Marques**  
Editor Responsável  
Diretor-geral do Instituto Adolfo Lutz

**Pedro Luiz Silva Pinto**  
Presidente da Comissão de Redação

### COORDENADORES DE ÁREAS:

**Marilena Oshiro**  
**Silvana Tadeu Casagrande**  
Área de Vigilância Epidemiológica

**Márcia Regina Pennacino do Amaral Mello**  
**Maria Ângela Pompeu Zorzetto**  
Área de Vigilância Sanitária

**Daisy Nakamura Sato**  
Área de Ações Básicas de Saúde

## Sumário

Vigilância da difteria no Brasil, alguns desafios na era pós-vacinal .....	2
A importância da participação em programas interlaboratoriais .....	3
Atuação da seção de análises clínicas auxiliares do IAL Central .....	5
A importância do laboratório frente à diabetes Mellitus .....	6
Avaliação preliminar do programa de monitoramento de água para hemodiálise do estado de São Paulo .....	6
A Erradicação do Sarampo para o ano 2000. Um compromisso internacional .....	8
Estudo citomorfológico e de microscopia eletrônica de infecções virais presentes em amostras de urina (estudo piloto) .....	10
Rearranjo de gene da cadeia pesada da Imunoglobulina: auxílio diagnóstico em linfoproliferações B .....	12
Identidade e qualidade de mortadela, lingüiça e salsicha. Instrução Normativa N°4 .....	12
Identidade e qualidade de produtos cárneos. Instruções Normativas N° 20, 21 e 22 .....	15
Regulamentos e normas para aflatoxinas em alimentos - CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), Mercosul, Codex Alimentarius e CE (Comissão Européia) .....	18
Dispensa da obrigatoriedade de registro de embalagens .....	19
Embalagem X Reciclagem X Meio Ambiente .....	20
NOTÍCIAS	
ANVISA libera etiqueta que adverte para o consumo humano do palmito em conserva .....	23
X Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas da IUPAC .....	23
AGENDA DE EVENTOS 2001 .....	25
REGULAMENTO .....	26

## Vigilância da difteria no Brasil: alguns desafios na era pós-vacinal

Luciana M. G. BRONDI

Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória – Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica – Centro Nacional de Epidemiologia, Ministério da Saúde.

A difteria é uma doença bacteriana aguda, que atinge inicialmente as membranas mucosas e a pele, localizando-se preferencialmente no trato respiratório superior tendo predileção pela região das amígdalas, faringe, laringe e do nariz, sendo que as mucosas conjuntiva e genital também podem ser atacadas. Na forma clássica, formam-se nas amígdalas e estruturas vizinhas placas pseudomembranosas brancas, brilhantes, que evoluem para cor acinzentada com pontos esverdeados de necrose<sup>1</sup>. A extensão desta membrana determina a gravidade do quadro por um lado e a toxina diftérica por outro, já que esta toxina pode levar ao comprometimento cardíaco e neurológico.

O agente etiológico da difteria é o bacilo gram positivo *Corynebacterium diphtheriae*, é imóvel e pleiomórfico e pode ou não apresentar toxigenicidade. Foi isolado pela primeira vez por Loeffler em 1884.

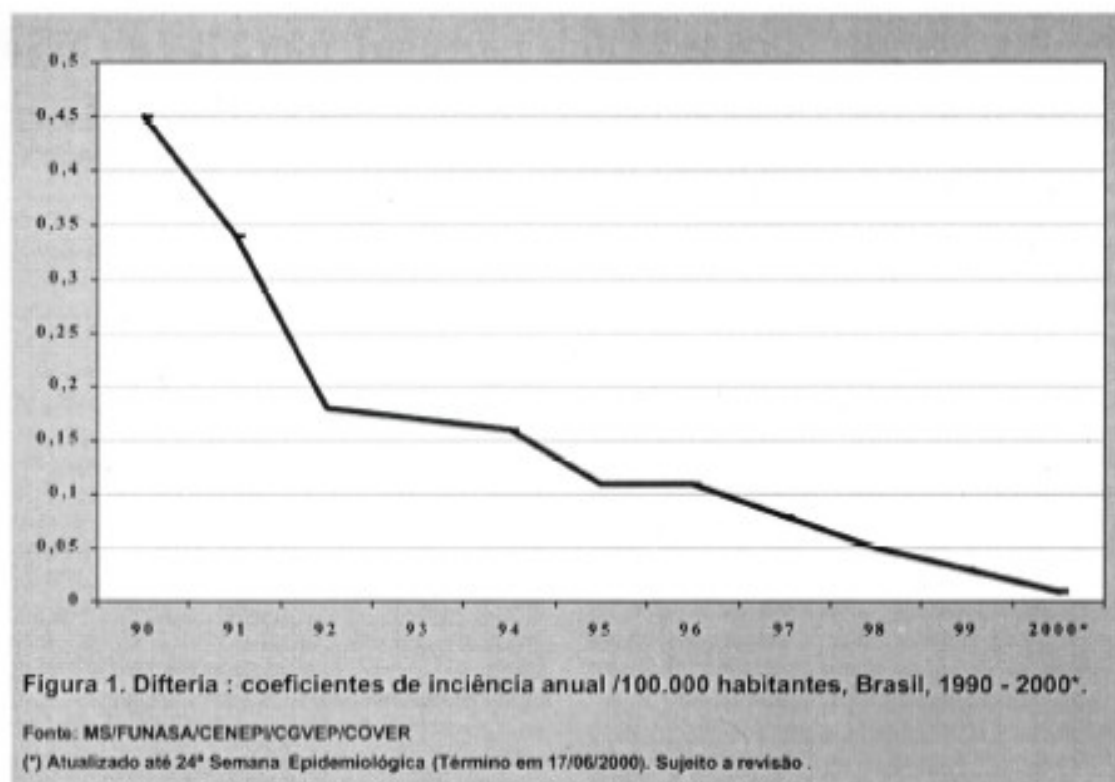
A referência específica de epidemias de "mal estar faríngeo" ocorreu pela primeira vez no século XVI, apesar de escritos hipocráticos sugerirem a existência da doença<sup>2</sup>. No início deste século a difteria constituía-se numa das causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em vários países do ocidente. As taxas de incidência da doença tiveram uma queda importante após a década de 40 após a introdução em larga escala da imunização com o toxóide diftérico. Para exemplificar, tomemos o exemplo da Inglaterra e país de Gales onde na década de 30 a difteria estava entre as três causas mais frequentes de mortes em crianças abaixo de 15 anos e que em 1998 teve apenas 23 casos da doença notificados sendo que destes, apenas em três houve o isolamento de *C. diphtheriae* toxigênico<sup>3</sup>.

No Brasil, de forma semelhante, as taxas de incidência da doença também vêm diminuindo principalmente desde a introdução da vacina DPT em âmbito nacional em 1973 (Figura 1). Em 1980, o coeficiente de incidência da difteria era de 3,9 por 100.000 habitantes, caiu para 0,45 em 1990, e em 1999 tivemos uma incidência de 0,03 casos por 100.000 habitantes com apenas 52 casos confirmados da doença. Estes números podem ser considerados um sucesso relativamente às altas taxas de incidência já referidas, porém, à medida que a ocorrência da difteria em nosso país começa a tornar-se um evento mais raro, novos desafios para a vigilância e o controle da doença se apresentam. Entre estes desafios citamos a existência de regiões e municípios no país com baixas coberturas vacinais para a vacina triplíce e dupla bacteriana, o deslocamento de faixa etária mais

atingida pela doença para jovens e adultos, a mudança das características dos casos da doença devido ao uso da vacina, piora das condições de vida da população com formação de núcleos de conglomeração de indivíduos suscetíveis, entre outros<sup>4,5,6</sup>.

Diante destes desafios e considerando que o sucesso no controle das doenças imunopreveníveis depende de atingir boas coberturas vacinais e manter uma vigilância adequada, o CENEPI propôs em 1999 uma estratégia para a melhoria da vigilância da difteria no país. Esta estratégia teve como princípio um trabalho integrado entre a vigilância epidemiológica e os laboratórios de saúde pública visando uma melhoria na detecção e confirmação dos casos da doença e a notificação, investigação e medidas de controle oportunas. Como achamos oportuna a ocasião e tivemos o apoio dos envolvidos no planejamento juntamente com as ações de melhoria da vigilância da difteria esta estratégia também prevê a melhoria da vigilância da coqueluche. Para atingir estes objetivos o CENEPI iniciou a execução de um plano de trabalho coordenado pela Coordenação Geral Nacional de Vigilância Epidemiológica/CENEPI, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/CENEPI, Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz-SP e Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjac-SES, SP (CVE). O plano envolve quatro fases sendo que até setembro de 2000 já capacitamos as 27 unidades federadas tanto para a vigilância epidemiológica quanto para o diagnóstico laboratorial destes dois agravos no país. Foram cinco treinamentos envolvendo as cinco regiões do país nos quais o CENEPI contou com um apoio muito grande de técnicos especialistas da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e da Divisão de Vigilância Epidemiológica de doenças de Transmissão respiratória do CVE de São Paulo.

A queda na incidência da difteria no Brasil e no mundo nas últimas décadas levou a uma relativização da importância das ações de vigilância deste agravo no país nos últimos anos. Entretanto, a análise cuidadosa dos dados de vigilância e de cobertura vacinal do país nos últimos anos, além da epidemia de grandes proporções ocorrida na antiga União Soviética na década de 90<sup>7</sup>, nos alerta para a importância de manter boas estratégias de controle da doença envolvendo uma boa vigilância da difteria, incluindo o papel do laboratório, além de coberturas vacinais adequadas e contínuo treinamento dos profissionais de saúde.



**Referências:**

1. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**. 5ª. ed. rev. ampl. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998.
2. Mandell, G. L.; Douglas, R. G.; Bennett, J. E. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5th edition. New York: Churchill Livingstone; 2000.
3. Public Health Laboratory Service. Diphtheria Homepage. <http://www.phls.co.uk/facts/dip.htm>
4. Galazka, A.M.; Robertson, S.E. Diphtheria: Changing patterns in the developing world and the industrialized world. **European Journal of Epidemiology**, 11:107-117, 1995.
5. Galazka, A.M.; Robertson S.E.; Oblapenko G.P.; Resurgence of Diphtheria. **European Journal of Epidemiology**, 11:95-105, 1995.
6. Vitek, C.R.; Wharton, M. Diphtheria in the Former Soviet Union: Reemergence of a Pandemic Disease. **Emerging Infectious Diseases**, 4(4): 1998.
7. Benenson A.(Ed.) **Control of Communicable Diseases Manual**. 16th Ed.; American Public Health Association, 1995.

## A importância da participação em programas interlaboratoriais

Paulo TIGLEA, Isaura A.OKADA, Franca D. MAIO, Maria Cristina DURAN, Maria de F. H. CARVALHO, Carmen S. KIRA, Alice M. SAKUMA

Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central. – Divisão de Bromatologia e Química – Seção Equipamentos Especializados

Durante a Segunda Guerra Mundial foram introduzidas muitas práticas e conceitos visando à qualidade dos produtos sêlicos (pela simples razão de que os equipamentos, produzidos em massa, não podiam falhar durante o uso, sempre em situações críticas. Após a guerra, estes conceitos e práticas sobre a Qualidade rapidamente se difundiram dos produtos de uso militar para os bens de consumo, visando uma garantia maior de satisfação do mercado, e logo estes conceitos foram também

incorporados pela área de prestação de serviços. Isto se consolidou também dentro da atividade laboratorial, que já aplicava, dentro de seus trabalhos, o uso da estatística. Nos últimos anos, a facilidade e rapidez dos meios de comunicação e o aumento de intercâmbios, dentro da tendência que se batizou de globalização, reforçou a necessidade da atenção à Qualidade 1).

Neste panorama, torna-se imperativo o acompanhamento e adoção de práticas relacionadas à Qualidade para uma



organização do porte do Instituto Adolfo Lutz que, entre as áreas de Biologia Médica, Patologia Clínica e Bromatologia e Química, realiza por ano milhares de exames diagnósticos e análises de produtos de interesse para a Saúde Pública (alimentos, medicamentos, cosméticos, embalagens para alimentos, medicamentos, entre outros), tanto como prestação de serviços aos produtores como dentro do Sistema de Vigilância Sanitária e Epidemiológica.

Com o surgimento de normas como a ISO17025 e com a implantação do Programa da Qualidade no Instituto, tornam-se necessárias diversas atividades, entre elas a validação dos métodos analíticos, sendo um dos requisitos a participação em programas interlaboratoriais (PI).

Em um PI, o organizador do programa produz uma amostra homogênea e a distribui aos demais laboratórios participantes, que então a analisam e retornam os seus resultados ao organizador, permitindo o tratamento estatístico<sup>7</sup>.

Os participantes de um PI podem periodicamente comparar seus resultados, exatidão e precisão, obtidos em processos metrológicos, com os resultados de outros laboratórios que realizam os mesmos tipos de ensaios. Assim, os principais objetivos de um programa interlaboratorial são: compatibilização de resultados, possibilidade de auto-avaliação, comparação de resultados obtidos usando diferentes técnicas analíticas, teste de métodos ou desempenho do laboratório e obtenção de materiais de referência certificados<sup>8,9</sup>. De acordo com os seus resultados, um laboratório também pode usar essa participação como um dos itens necessários para sua certificação e credenciamento.

As principais vantagens da participação em um PI<sup>2</sup> são: a redução dos erros nos resultados, devido à possibilidade de identificação de erros aleatórios e/ou sistemáticos, permitindo ações corretivas; o estímulo à auto-avaliação do laboratório e do analista, tornando mais perceptível a necessidade de treinamentos e mudanças nos procedimentos analíticos; a redução dos custos analíticos pela diminuição do número de repetições de uma análise; o aumento da confiança dos clientes, pela redução do número de erros e pela possibilidade da demonstração do desempenho do laboratório.

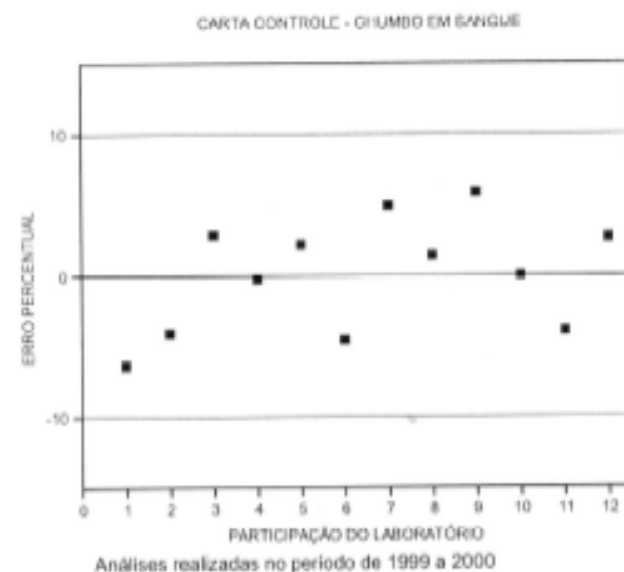
Dessa maneira todo o investimento humano, de material e de tempo, resultará na obtenção de resultados analíticos mais confiáveis.

A Seção de Equipamentos Especializados sempre teve a preocupação e empenho em garantir a confiabilidade dos resultados analíticos, e para isso tem participado de programas interlaboratoriais internacionais desde 1982, para o controle de nutrientes inorgânicos e metais pesados em alimentos. Desde 1991 a Seção vem participando do Programa Interlaboratorios de Control de Calidad – Chumbo em sangue – Zaragoza-Espanha, e Programa Interlaboratorios de Control de Calidad de mercúrio e cromo na urina – Santander-Espanha.

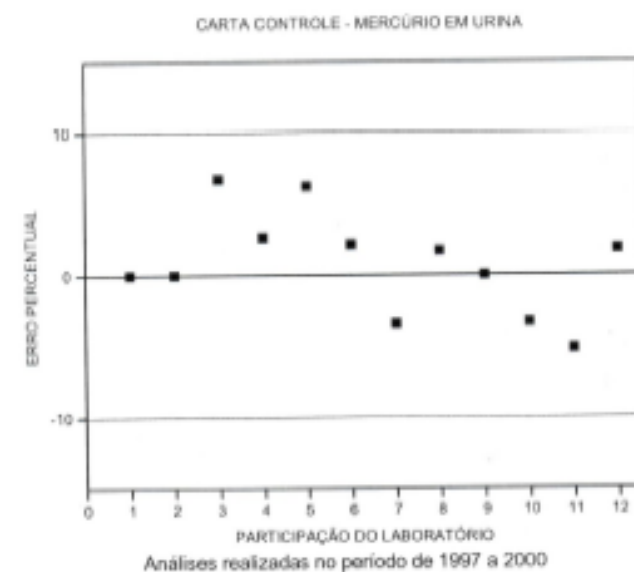
No início dos anos 90 chegaram a existir questionamentos por parte dos médicos de Programas de Saúde do Trabalhador, e a participação em PI contribuiu para a melhoria da confiança mútua (programa/laboratório).

A seguir, colocamos alguns gráficos demonstrativos do desempenho do laboratório.

É possível observar, por exemplo, que o laboratório apresenta seus resultados dentro de níveis satisfatórios de erro e ainda, que não apresenta erros sistemáticos.



As participações nos diversos PIs proporcionaram ainda, além das vantagens de participação já citadas, um aperfeiçoamento do laboratório como um todo.



#### Referências:

1. Stratton, B. Quality goes to war: an overview. *Quality Progress*, 24(12): 18, 1991.
2. Garfield, F. M. *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*. AOAC International; 1994. p.87-94.
3. Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G. *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. New York: VCH Publishers; 1995. p.153-174.

# Atuação da Seção de Análises Clínicas Auxiliares do IAL Central

Rosângela Andréa BORIOLI, Denise Hage RUSSO, Valter RUVIERI  
Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Patologia - Seção de Análises Clínicas

A Seção de Análises Clínicas Auxiliares tem como característica atividades laboratoriais voltadas à bioquímica clínica, que permitem a elucidação do diagnóstico e controle de doenças crônico-degenerativas e infecciosas como diabetes e hepatite.

A Bioquímica com seu grande desenvolvimento como ciência básica e com a crescente possibilidade de abordar todos os problemas de sua alçada em termos de extrema precisão técnica, passou a constituir um considerável estímulo à medicina.

Neste sentido e dentro do contexto institucional de atuar com qualidade, a Bioquímica da Divisão de Patologia vem desenvolvendo suas atividades aprimorando de forma crescente as metodologias a serem aplicadas no âmbito da sensibilidade e especificidade. No ano de 1999 realizou 39.706 exames bioquímicos, dos quais 9.877 (24,9%) voltados ao Controle de Qualidade, nas atividades de apoio diagnóstico, pesquisa e estabelecimento de metodologias.

Na caracterização de doenças crônico-degenerativas e infecciosas foram realizadas 33.362 (8,5%) reações para diagnóstico e/ou avaliação da conduta terapêutica para Diabetes mellitus; 4.320 (10,9%) para Doenças Crônico-Degenerativas e 1.881 (4,7%) para Doenças Infecciosas.

Ainda em 1999, com um quadro de 11 profissionais, tivemos 10 resumos/comunicações apresentados em anais de Congressos nacionais e 1 internacional, 12 participações em eventos científicos, 7 participações em Cursos de Atualização, 14 promoções de reuniões científicas/cursos para graduados, 2 aulas ministradas em cursos promovidos na Instituição, 10 aulas em outras Instituições, 3 participações em bancas de concursos/tese, 5 assessorias prestadas e 7 estagiários voluntários.

A Seção de Análises Clínicas atualmente vem desenvolvendo 90% de suas atividades laboratoriais de forma automatizada, utilizando equipamentos específicos como: Cobas Mira Plus - ROCHE para dosagens bioquímicas, Clinitek 200 - AMES

para leitura de tiras reagentes de urina, Microtech 648 - INTERLAB, Itália para perfis eletroforéticos, Espectrofotômetro UV - VIS, HP 8453 para dosagens enzimáticas, quantificação de DNA e Controle de Qualidade.

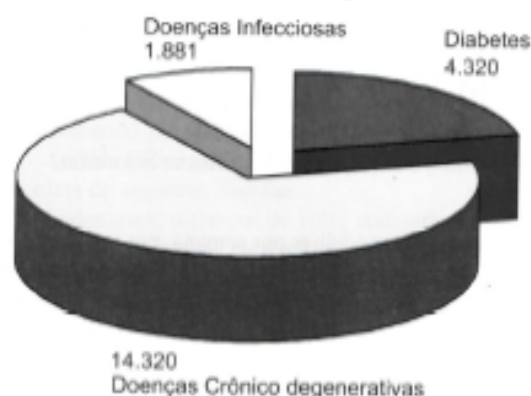
Atualmente vêm sendo implantadas e padronizadas novas metodologias para dosagens hormonais visando resultados mais sensíveis e precisos, respondendo assim à necessidade da saúde populacional de forma mais eficiente, além de estar desenvolvendo o Programa de Qualidade com os Laboratórios da Rede.

No âmbito da pesquisa científica vem desenvolvendo projetos voltados à doenças crônico-degenerativas como a Diabetes, utilizando metodologias moleculares e efetivando o estudo hormonal para a Saúde da Mulher.

## N.º de Exames Bioquímicos Realizados em 1999

N.º de Casos	Tipos de Exames	% de Alterações
7059	Glicose	39,6
709	Hemoglobina Glicada	30,3
1091	Uréia	9,5
1488	Creatinina	12,6
32	Clearence de Creatinina	75,0
968	Ácido Úrico	20,7
4388	Colesterol Total	50,6
2653	HDL - Colesterol	10,4
3876	Triglicérides	24,1
144	Eletroforese de Lípidos	22,2
241	Aspartato Amino Transferase	15,8
241	Alanina Amino Transferase	24,5
72	Fosfatase Alcalina	37,5
42	Gama Glutamil Transferase	2,4
79	Bilirubinas	21,5
27	Desidrogenase Láctica	7,4
123	Proteínas Totais	24,4
209	Eletroforese de Proteínas	32,5
10	Cálcio	90,0
8	Fósforo	100,0
6	Cálculo Urinário	100,0
3142	Urina Tipo I	52,1
3142	Glicosúrias	4,6
3412	Proteinúrias	1,8
3142	Urobilinogênio	0,1
6	Sangue Oculto	100,0
64	Glicosúrias de 24 horas	50,0
15	Proteinúrias de 24 horas	40,0
3	Proteína de Bence Jones	0,0
8	Curva Glicêmica	0,0
35.938	TOTAL	25,4

## Caracterização dos Exames Bioquímicos Alterados



# A importância do laboratório frente à Diabetes Mellitus

Denise H. RUSSO

Instituto Adolfo Lutz Central – Seção de Análises Clínicas – Divisão de Patologia

O Diabetes Mellitus (DM) é classificado como Tipo I ou Diabetes insulino-dependente (DMID) e Tipo II ou Diabetes não insulino-dependente (DMNID) e abrange uma série de alterações crônicas ou de evolução prolongada, na qual estão afetadas as formas pelas quais o organismo utiliza os alimentos com o objetivo de reduzir a energia necessária para a vida. No diabetes existe fundamentalmente uma alteração do metabolismo dos carboidratos (açúcares e glicogênio), embora também esteja afetado o metabolismo das gorduras e das proteínas; existem também outras doenças, tais como a intolerância à glicose, o diabetes na gravidez e o diabetes originados por doenças pancreáticas. Seja qual for o tipo de diabetes, é essencial que seja realizado um controle metabólico.

Os carboidratos (açúcar e amidos) que são ingeridos por nós através dos alimentos são degradados no estômago e no intestino, transformando-se em glicose. A glicose é transportada através da corrente sanguínea do intestino até o fígado, onde é armazenada como fonte de energia. O pâncreas, através da insulina, controla a quantidade de açúcar que é armazenada e liberada no fígado, para ser utilizada em todo o organismo. A insulina exerce também um controle sobre as células das fibras musculares, do tecido adiposo, dos rins e em outros órgãos. Quando os níveis de insulina não são adequados, essas células não absorvem o açúcar da corrente sanguínea e conseqüentemente não recebem uma nutrição adequada.

A insulina é um hormônio essencial produzido pelo pâncreas e que é liberado para a corrente sanguínea, fixando-se individualmente à célula em locais específicos conhecidos como receptores; uma vez fixada, possibilita que o açúcar ou a glicose (dos alimentos que ingerimos) penetre no fígado, nos adipócitos e nas fibras musculares, onde é utilizada para a produção de energia.

As análises laboratoriais rotineiras para o controle do diabetes, compreendem: glicemia, glicosúria, cetonúria e protei-núria. Além destas, são recomendadas provas que avaliem as

funções renal como o clearance de creatinina, o controle metabólico a médio prazo com a dosagem de hemoglobina glicada e o controle das frações lipídicas (colesterol total, HDL e LDL colesterol, triglicérides e lipoproteínas). Estas análises permitem o controle do diabetes, a prevenção e retardamento das conseqüências que ocorrem com esta síndrome como: retinopatia diabética, nefropatia e neuropatia.

Na rotina laboratorial, a dosagem de hemoglobina glicada tem sido de grande valia no controle de diabéticos pois ela é formada continuamente pela adição da glicose ao N-terminal da cadeia da hemoglobina; por se tratar de reação irreversível e tendo a hemoglobina vida média de 120 dias, sua dosagem reflete a concentração sanguínea de glicose nesse período.

Com a necessidade de novos parâmetros para o controle e prevenção desta síndrome, a Biologia Molecular tem assumido posição de destaque. São reportados que os fatores genéticos contribuem para a etiologia do DMNID e que defeitos genéticos específicos estão sendo identificados. A literatura demonstra a importância desta tecnologia no estudo do DM e as tentativas de identificação dos genes específicos envolvidos na patogênese da doença dependem principalmente do estudo dos genes candidatos. Estudos realizados no Japão mostram que mutações no gene da glicoquinase são as maiores causas de DMNID; em pequenos grupos de pacientes diabéticos foram encontradas mutações na molécula de insulina e no seu receptor de membrana plasmática. Porém, os genes envolvidos no DMNID ainda não são totalmente conhecidos.

## Referências:

1. <http://www.genomic.com.br/inst/>
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/disease/Diabetes.html> – Genes and disease
3. Wagener C. Molecular Diagnostics. *J. Mol Med*, 75 (10): 728-44, 1997.
4. Wajchenberg, B. L. *Tratado de Endocrinologia Clínica*, Ed. Roca.

## Avaliação preliminar do programa de monitoramento de água para hemodiálise do estado de São Paulo

Centro de Vigilância Sanitária, Instituto Adolfo Lutz Central e Regionais e Equipes de Vigilância Sanitária.

### Introdução

No Estado de São Paulo existem cerca de 12.000 (doze mil) pacientes renais crônicos, dos quais aproximadamente 90% dependem de procedimentos de hemodiálise. Durante uma sessão de tratamento, cada paciente é indiretamente exposto à cerca de 120 L de água<sup>1</sup>, e o mesmo é submetido em média a 3

(três) sessões de hemodiálise por semana; por isso a pureza da água é um dos fatores que influencia na qualidade do tratamento e na segurança do paciente. O grande volume de solução e o tempo de exposição permitem a passagem de substâncias de baixo peso molecular e estas têm acesso direto à corrente sanguínea do paciente, podendo acumular-se no organismo.

A deficiência da função renal ocasiona alterações fisiológicas e bioquímicas, resultando na elevação dos níveis de creatinina e uréia no sangue. Os métodos dialíticos, principalmente a hemodiálise e a diálise peritoneal são artificiais, desenvolvidos para remover essas substâncias tóxicas do organismo, restabelecendo o balanço hidroeletrólítico e ácido-base<sup>1,2</sup>. Dos contaminantes metálicos, presentes com mais frequência na água, o alumínio é que causa maior problema aos doentes renais crônicos; a sua toxicidade é caracterizada por encefalopatia da diálise (demência), doença óssea e agravo da anemia<sup>3,4</sup>.

A água de abastecimento usada nos serviços de diálise pode ser proveniente da rede pública, dos poços artesanais ou de outros mananciais e deve obedecer aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos estabelecidos na portaria GM/MS nº 36 de 19/01/90<sup>5</sup>. Essa água, para ser utilizada na preparação da solução para diálise, deve passar por diversas fases de tratamento que incluem filtros, colunas trocadoras de íons ou sistema de osmose reversa de tal forma a garantir a qualidade e atender aos parâmetros da portaria GM/MS nº 82 de 03/01/00 publicada no D.O.U de 11/02/00<sup>6</sup>. Esta Portaria estabelece limites mais restritivos que os da água potável tendo em vista a maior suscetibilidade dos pacientes aos contaminantes, em função da atividade renal diminuída. O tipo do sistema de tratamento da água para hemodiálise e a periodicidade da manutenção vão definir a qualidade da água. Os deionizadores são eficientes na remoção de íons, porém não removem bactérias ou endotoxinas, que são responsáveis pela bacteremia. O sistema de osmose reversa além de retirar os íons elimina também as bactérias e endotoxinas. Quando se usa deionizadores necessariamente deve ser usado um sistema de filtração para a eliminação de endotoxinas. As endotoxinas derivadas de bactérias Gram-negativas podem penetrar através da membrana dialisadora e ocasionar reações de pirogênio no paciente.

O Programa conjunto CVS, IAL Central, IAL Regionais e Equipes de Vigilância Sanitária foi estabelecido para monitorar a qualidade da água usada para o preparo de soluções para hemodiálise nas 124 (cento e vinte e quatro) clínicas do Estado de São Paulo, avaliando os parâmetros microbiológicos, físico-químicos, endotoxinas e a presença de metais. O programa teve início em dezembro/1999 e terminou em julho/2000.

## Material e Métodos

### Material

Para a coleta das amostras foram fornecidos frascos ou sacos previamente descontaminados para cada tipo de análise:

Análise Microbiológica: saco de polietileno de 100 mL, estéril, contendo pastilhas de tiosulfato de sódio.

Análise Físico-química: saco de polietileno de 300 mL para coleta de amostras líquidas.

Endotoxina: 4 frascos de vidro com tampa rosqueável, despirogenados em calor seco a 250° C, por 3 horas.

Metais: foram fornecidos quatro frascos de polietileno quimicamente descontaminados, contendo conservantes apropriados.

Foram coletadas 130 amostras de água em 106 clínicas, sendo que em algumas foi feita mais de uma coleta, no período

de dezembro/1999 a julho/2000. Foram realizados um total de 2117 ensaios.

### Métodos

1. Bactérias do grupo coliforme – Técnica de membrana filtrante. Contagem de bactérias heterotróficas – Semeadura em placas de Petri estéreis, método "pour plate"<sup>7</sup>.
2. Endotoxina – Método de LAL por gelificação<sup>8</sup>
3. Fluoretos – Método potenciométrico com eletrodo seletivo de fluoreto.
4. Nitratos – Reação com ácido fenildissulfônico e leitura em espectrofotômetro na região visível<sup>9</sup>.
5. Sulfato – Kit HACH 2000
6. Metais – Alumínio, chumbo, cádmio e cromo total foram analisados utilizando espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite e corretor Zeeman instalado em uma sala limpa classe 100. O mercúrio foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica com gerador de vapor acoplado a um sistema de amalgamação. O bário, cálcio, cobre, potássio, magnésio, sódio e zinco foram determinados por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente.

## Resultados e Discussão

Os resultados de amostras insatisfatórias quanto aos parâmetros da Portaria<sup>5</sup> estão expressos na Tabela 1. Nesta tabela, consta também o número de clínicas que apresentaram resultados insatisfatórios. Com relação ao cromo, cádmio, chumbo, cobre, e mercúrio, todas as amostras apresentaram resultados abaixo dos limites de quantificação dos métodos que são respectivamente: 0.001; 0.0002; 0.001; 0.01 e 0.0001 mg/L. Os teores de sódio, bário e zinco de todas as amostras analisadas estavam abaixo dos valores estabelecidos pela legislação.

**Tabela 1.** Número de amostras de água para hemodiálise analisadas, clínicas e parâmetros insatisfatórios

Parâmetro	Número de Amostras Analisadas	Amostras insatisfatórias		Clínicas Insatisfatórias	
		N	%	N	%
Alumínio	129	11	8.5	9	8.5
Cálcio	129	10	7.8	10	9.4
Potássio	129	1	0.8	1	0.9
Magnésio	129	1	0.8	1	0.9
Endotoxina	113	30	26.5	28	28.6
Bactérias heterotróficas	110	20	17.5	17	18.1
Coliforme total	110	1	0.9	1	1.1
Fluoretos	114	17	14.9	16	17.0
Sulfatos	110	4	3.6	3	3.2
Condutividade	110	8	7.3	8	8.5
Nitratos	114	3	2.6	3	3.2

No total das 130 amostras analisadas, 53 estavam em desacordo com a portaria que correspondem a 40,8%. Das 106 clínicas amostradas, 39 (36,8%) apresentaram resultados em não conformidade em relação à água. Destas clínicas foram re-amostradas 16, no mínimo 2 e no máximo 5 vezes; os resultados analíticos obtidos de 6 clínicas (37,5%) foram satisfatórios e as demais continuaram apresentando a qualidade insatisfatória da água.

Os dados obtidos do presente monitoramento são importantes para avaliar e sugerir o que segue:

1. A relação das amostras insatisfatória representa riscos aos pacientes renais e devem ser avaliadas inclusive com dados epidemiológicos;
2. A continuidade do trabalho conjunto entre as instituições participantes, pois com a colaboração de todos foi possível avaliar nesta primeira fase 85% das clínicas de hemodiálise do Estado de São Paulo.
3. O presente Programa deve continuar, por sua importância à saúde pública e para garantir uma melhor qualidade nos tratamentos dialíticos.

Devido a problemas técnico-operacionais, nem todas as amostras foram analisadas em relação a todos os parâmetros.

#### Referências:

1. Draibe, S. et al. Os processos dialíticos. *Ciência Hoje*, 18: 42-47, 1994.
2. Electrolyte Replacement, Nutrient, Fluids and Dialysis Solutions. In: *Peritoneal Dialysis and Haemodialysis Preparations*. The Pharmaceutical Codex, 20th ed. Ed. Walter Lund. London: Pharmaceutical press, 1994, p. 620-625.
3. Centro de Vigilância Sanitária - Tratamento da Água para Hemodiálise. In: *Vigilância Sanitária de Serviços de Terapia Renal Substitutiva: Implantação do Roteiro de Inspeção em Unidade de Diálise*, São Paulo, 1997, p. 55-67.
4. Brasil. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990. *Diário Oficial*, Brasília, 23 de janeiro de 1990, Seção I, pt 1.
5. Brasil. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 82, de 03 de janeiro de 2000. *Diário Oficial*, Brasília, 11 de fevereiro de 2000, Seção I, pt 1.
6. United States Pharmacopeia, 24<sup>a</sup> ed., 2000.
7. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19<sup>a</sup> ed., 1995.
8. D'Haese, P.C. ; De Broe, M. E. Adequacy of dialysis fluids. *Nephrol. Dial. Transplant*, 11 (2): 92-97, 1996.
9. Simões, J. et al. Cela n'arrive qu'aux autres aluminum intoxication only happens in the other nephrologist's dialysis centre. *Nephrol. Dial. Transplant*, 9: 67-68, 1994.

## A erradicação do sarampo para o ano 2000 Um compromisso internacional

Neuma T. R. HIDALGO, Telma R. M. PINTO

Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória/C.V.E./C.I.P./S.E.S.-SP

O sarampo constitui uma das principais causas de morbimortalidade entre crianças menores de 5 anos de idade, sobretudo em países subdesenvolvidos.

No Brasil, o sarampo é doença de notificação compulsória desde 1968, porém até o início da década de 1990 este agravo apresentava-se como uma doença endêmica com picos epidêmicos a cada 2 ou 4 anos.

Dentro deste contexto o Brasil assumiu, como política prioritária, sua eliminação e para isso implantou em 1992 o Plano Nacional de Eliminação do Sarampo cujo marco inicial foi a Campanha de Vacinação realizada naquele ano, com impacto imediato, levando a uma redução de 81% em relação ao número de casos notificados.

O compromisso da eliminação, hoje erradicação, foi ratificado em 1994 durante a XXIV Conferência Sanitária Pan-americana, definindo como meta a eliminação do sarampo do Hemisfério Ocidental até o ano 2000, por ocasião da solenidade de entrega do Certificado de Erradicação da Poliomielite na Região das Américas.

A vacina contra o sarampo faz parte do calendário de vacinação de rotina do Estado de São Paulo desde 1968.

Apesar da reconhecida eficácia de 95% dessa vacina, até 1987 o sarampo ainda ocorria no Estado com morbidade elevada entremeada com epidemias. Além disso, foi demonstrado que essa doença estava entre as 10 primeiras causas de

óbito entre as crianças de 1 a 4 anos de idade, o que reforçava a sua importância em saúde pública. Entre as causas prováveis para explicar este fato, citam-se: baixas coberturas vacinais ou falha em se manter coberturas elevadas e homogêneas, múltiplas mudanças no calendário vacinal, bem como falhas vacinais decorrentes de problemas com a cadeia de frio ou aplicação do imunobiológico em idade muito precoce (com a presença dos anticorpos maternos).

Tendo em vista essa situação, o Estado de São Paulo, em 1987, baseado em experiência cubana, foi pioneiro no Brasil na adoção da campanha indiscriminada de vacinação contra o sarampo, também denominada como "catch up" e hoje recomendada pela OPS (Organização Pan-americana de Saúde) como uma das estratégias para a erradicação da doença, a qual prevê a vacinação de todas as crianças a partir dos 9 meses de idade até os 14 anos completos de idade, independente do estado vacinal anterior e de ter tido ou não o sarampo. A cobertura vacinal foi de 91% nesta campanha.

O impacto epidemiológico obtido com essa medida foi muito bom. Houve uma redução de 98% na incidência e de 100% no número de óbitos nos anos seguintes.

Isso ocorre porque, com o "catch up", desde que se consiga atingir altas coberturas, interrompe-se efetivamente a cadeia de transmissão do vírus, fenômeno denominado por alguns como "honeymoon" (lua de mel), ou seja, um período

em que a incidência cai a níveis muito baixos, representados praticamente apenas por casos importados de áreas em que o vírus circula livremente.

No entanto, mesmo com o incremento das ações de vigilância epidemiológica, como é recomendado após um "catch up", ou seja: descobrir precocemente novos casos, realizar bloqueios vacinais na suspeita clínica, além de manter altas coberturas com a vacinação de rotina; estas não foram suficientes para controlar a doença (muito menos para erradicá-la), porque, além das coberturas não terem sido homogêneas, a cada ano acumularam-se suscetíveis, devido a:

1. falta de contato com o vírus selvagem (pois ele está circulando menos);
2. crianças que não têm acesso à vacina (raramente se consegue cobertura de 100%);
3. falha da vacina, conhecida como primária (a eficácia é de 95%);
4. migração de pessoas de áreas onde não ocorrera a exposição ao vírus selvagem ou vacinal.

Modelos matemáticos que consideram, entre outros fatores, a dinâmica de transmissão do vírus do sarampo, demonstram que, quando o acúmulo de suscetíveis for igual à "coorte" de nascidos vivos do local que está sendo avaliado, poderá ocorrer uma epidemia se o vírus selvagem estiver circulando ou se houver a sua reintrodução.

Em 1991, esse fenômeno foi avaliado em São Paulo por técnicos do CVE com a colaboração de técnicos do CDC (Walter Orenstein) e da OPS (Ciro de Quadros), chegando-se à conclusão que, de 1987 até aquela data, já se acumulara 700.000 suscetíveis.

Desencadeou-se a chamada "campanha de seguimento", ou seja, uma nova vacinação indiscriminada, que foi realizada em 1992. Enquanto o Ministério da Saúde adotava, para todos os estados, a estratégia de "catch up" com a vacina monovalente contra o sarampo, São Paulo introduzia a vacina tríplice viral no calendário (contra a caxumba, a rubéola e o sarampo) visando também o controle da rubéola e da síndrome da rubéola congênita.

As campanhas de seguimento, conhecidas também por "follow up", devem ser realizadas para se evitar a ocorrência de epidemias após um período de baixas incidências e consiste na vacinação indiscriminada contra o sarampo, de crianças de 9 meses a 5 anos completos.

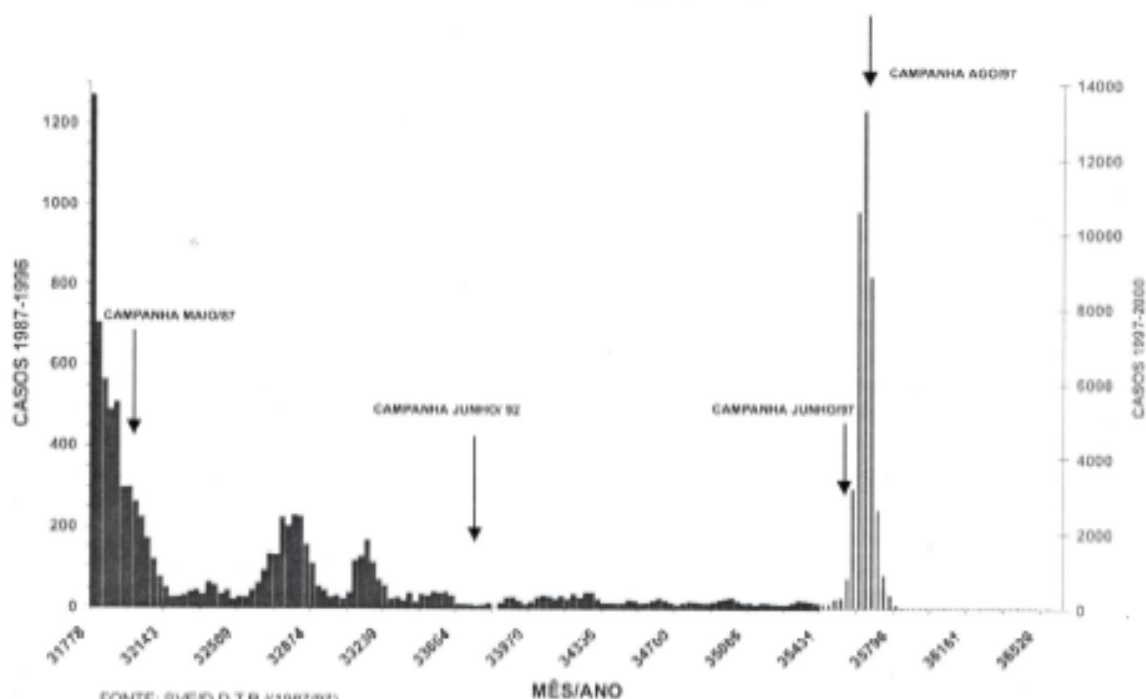
Essa estratégia adotada e a manutenção da vigilância proporcionou a São Paulo o efetivo controle do sarampo, fechando o ano de 1995 com apenas 9 casos confirmados por laboratório em todo o Estado.

Acreditou-se, com base nos dados administrativos, que as coberturas vacinais contra o sarampo eram altas, o que proporcionaria um espaço maior entre as campanhas de seguimento.

Porém, a epidemia começou antes, já em 1996. Em 1997, aproximadamente 42.000 casos foram confirmados por laboratório e pela clínica no Estado, com 42 óbitos conhecidos. No Brasil, foram 53.000 casos.

Em agosto foi realizada uma campanha de vacinação, indiscriminada até os 5 anos, obtendo-se o controle da epidemia. O gráfico, a seguir, demonstra uma série histórica do sarampo (casos confirmados) de 1987 a junho de 2000 e as setas destacam as campanhas realizadas.

**SARAMPO CONFIRMADO (LAB E CLÍN) SEGUNDO MÊS E ANO  
ESTADO DE SÃO PAULO, 1987 A 2000**



FORNTE: SVE/D.T.R.(1987/97)  
SINAN+ IAL(1998/2000).

Em 1998 e 1999 ocorreram 252 e 109 casos confirmados por laboratório respectivamente no Estado. Para esse ano, até a presente data, confirmaram-se 20 casos por laboratório, a maioria na faixa etária dos 9 – 11 meses.

Os indicadores de qualidade do sistema de vigilância do sarampo evidenciam que, nesses dois últimos anos, em média, apenas 64% dos municípios atingiram uma cobertura vacinal de 95%. Este fato e a falha primária da vacina levam ao acúmulo de suscetíveis.

Tendo em vista a meta de erradicação do sarampo nas Américas até o ano 2000 e considerando o risco da ocorrência de nova epidemia, foi realizada uma campanha de seguimento no Estado em junho (1ª fase) e agosto (2ª fase), com uma cobertura de 100,72%.

É preciso manter altas coberturas vacinais entre as crianças menores de 5 anos, diminuir ao máximo o número de crianças suscetíveis com as campanhas de seguimento para garantir a interrupção da cadeia de transmissão, protegendo também os adultos não imunizados.

#### Referências:

1. Davis, R.M. et al. A persistent outbreak of measles despite appropriate prevention and control measures. *Am. J. Epidemiol.*, 126: 438-49, 1987.
2. Expanded Programme of Immunisation. Meeting on advances in measles elimination: conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiol. Rev.*, 71: 305-12, 1996.
3. Pan American Health Organization. Measles elimination by the year 2000. *EPI Newsletter*, 16: 1-2, October 1994.
4. Pan American Health Organization. The fight against measles continues: Brazil and Chile carry out mass vaccination campaigns. *EPI Newsletter*, 14: 2-5, June 1992.
5. Quadros, C.A. et al. Measles Elimination in the Americas. *JAMA*, 275(3): 224-9, 1996.
6. Shasby, D.M. et al. Epidemic measles in a highly vaccinated population. *N. Engl. J. Med.*, 296: 585-9, 1977.
7. Chen, R.T. et al. A post-honeymoon period measles outbreak in Muyinga province, Burundi. *Int. J. Epidemiol.*, 23: 185-93, 1994.

## Estudo citomorfológico e de microscopia eletrônica de infecções virais presentes em amostras de urina. (estudo piloto).

Maria Lucia UTAGAWA<sup>1</sup>, Adhemar LONGATTO FILHO<sup>1</sup>; Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO<sup>1</sup>, Marli UEDA<sup>2</sup>, Jonas José KISIELIUS<sup>2</sup>, Renata Marconi CUSTÓDIO<sup>2</sup>, Cecília Maria ROTELP

<sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz – Central – Divisão de Patologia – Setor de Citologia Oncótica<sup>1</sup> e <sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz – Central – Divisão de Biologia Médica – Seção de Microscopia Eletrônica

<sup>3</sup>Hospital Leonor Mendes de Barros

#### Introdução

No exame citológico de sedimento urinário podemos detectar alterações citopáticas compatíveis com Papilomavírus humano (HPV), Citomegalovírus (CMV), Adenovírus, Herpes vírus (HSV) através da coloração de Papanicolaou<sup>3,5</sup>. Têm sido relatados estudos por microscopia eletrônica (ME) sobre a presença de HPV, CMV e parvovírus-like em amostras de urinas de pacientes com diversos quadros clínicos<sup>1,2,3,6,8</sup>. Atualmente, com o desenvolvimento de metodologias moleculares, esses vírus têm sido diagnosticados por esses métodos. Porém, na literatura existem poucos relatos de Adenovírus, HSV, poxvírus, enterovírus em amostras de urina. O aspecto macroscópico da urina poderá inferir as condições patológicas do trato urinário; normalmente é clara e o grau de coloração depende da concentração urinária. A coloração anormal é devido a bilirrubinúria, que dá uma coloração marrom amarelada ou marrom esverdeada, em outras condições como hematúria, hemoglobinúria e o uso de alguns medicamentos apresentam tom avermelhado<sup>10</sup>.

O objetivo desse trabalho através da ME foi verificar a viabilidade da citologia para identificação de alterações citopáticas virais em amostra de urina.

#### Material e Método

O presente estudo se concentra em 44 amostras de sedimento urinário, obtidas por micção espontânea, de mulheres com faixa etária entre 19 e 65 anos oriundas do ambulatório do Hospital Leonor Mendes de Barros. O material foi colhido no dia da consulta antes do exame ginecológico em frascos apropriados e posterior conservação em geladeira a 4°C. Cada amostra foi submetida à citocentrífuga a 1500 rpm durante 5 minutos para concentração das células, e posteriormente coradas pelo Método de Papanicolaou. Foram realizadas 10 lâminas de cada amostra para estudo citomorfológico. Todas as amostras citológicas foram avaliadas e discutidas por três citologistas. Consideramos os casos sugestivos/positivos para infecção viral os esfregaços que apresentaram discariose, disqueratose, hiper Cromatismo, binucleação e coilocitose. Simultaneamente, parte do sobrenadante e sedimento das amostras urinárias foram submetidas à microscopia eletrônica utilizando a técnica de imunomicroscopia eletrônica (IME) em ágar, com pool de soros de 13 pessoas saudáveis na diluição de 1: 250 padronizada por Kisielius et al.<sup>5</sup>. O produto das reações de IME depositadas sobre as grades de ME, recobertas com formvar e carvão, foram coradas negativamente e observadas e fotografadas em microscópio eletrônico Phillips EM-400T, operando a 8kV.

## Resultado

No exame citológico foram detectados 9/44 (20,5%) com alterações citopáticas sugestivas de infecção viral, sendo 4/44 (9,1%) tinham lesões clinicamente suspeitas de infecção por HPV. Pela IME foram detectados partículas de vírus em 5/44 (11,4%), das amostras analisadas das quais 2/44 (4,5%) apresentavam morfologia de Adenovírus, 1/44 (2,3%) parvovírus-like e 2/44 (4,5%) enterovírus-like.

As amostras com Adenovírus apresentavam, também, história clínica de HPV, sem apresentarem contudo alterações citopáticas compatíveis com infecção viral. As amostras em que foram diagnosticados parvovírus e enterovírus pela IME, apresentaram citologia com alterações citopáticas compatíveis com infecção viral. Com relação ao aspecto da urina, observamos apenas um caso de Adenovírus em amostra sanguinolenta compatível com os dados da literatura<sup>4</sup> (Tabela 1).

## Discussão e Conclusão

Não foram observados papovavírus ou herpesvírus nas

amostras analisadas. Há possibilidade do anticorpo anti-papovavírus não estar presente neste *pool* de soros utilizado na reação de IME, se neste *pool* for acrescido um soro anti-papovavírus, poderá ocorrer um aumento da detecção destes vírus. Nosso achado de 6,8% de Adenovírus pode ser considerado importante, pois, a detecção desses vírus em urina diretamente por ME tem sido pouco relatado na literatura<sup>7</sup>.

A eliminação dos enterovírus-like e parvovírus-like nas amostras de urina em diferentes quadros clínicos necessitam de maiores estudos, para o esclarecimento de vários aspectos da infecção por esses vírus.

Concluimos que o exame citológico é um método eficaz para detectar em urina alterações citopáticas compatíveis com infecções virais ginecológicas devido a sua facilidade e baixo custo porém não podemos descartar a possibilidade de contaminação do trato genital feminino. A IME em conjunto com o citodiagnóstico pode ser uma ferramenta importante no auxílio diagnóstico dos agentes virais<sup>7</sup>, principalmente em cistite hemorrágica que será enfoque do próximo estudo.

**Tabela 1.** Principais achados citopatológicos e de microscopia eletrônica em 44 amostras de sedimento urinário

Caso	Idade	Análise citológica			M.E.	Clínica ginecológica*	Aspecto da urina
		A	B	C			
1	19	-	Sug	-	Adenovírus	HPV/gestante	Amarelo claro
3	27	-	-	-	Adenovírus	HPV	Sanguinolento
11	24	-	-	-	Enterovírus	Condiloma	Amarelo claro
35	37	Pos	Pos	Pos	Enterovírus	Leucorréia	Amarelo claro
12	14	Sug	Sug	Sug	Parvovírus	Condiloma	Amarelo claro

M.E. = Microscopia eletrônica

\* sem evidências clínicas de acometimento do sistema urinário das lesões virais da genitália.

sug. = alterações citopáticas sugestivas de infecção viral

pos. = alterações citopáticas de infecção viral

A, B e C = citologistas

## Referências:

1. Coleman, D.V. et al. Human papovavirus in Papanicolaou smears of urinary sediment detected by transmission electron microscopy. *J. Clin. Pathol.*, 30:1015-1020, 1977.
2. Henry, C. et al. Detection of viruria in cytomegalovirus-infected infants by electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.*, 69:435-439, 1978.
3. Hills, E.; Laverty, C.R. Electron microscopic detection of Papillomavirus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. *Acta Cytol.*, 23(1):53-56, 1979.
4. Kawakami, M. et al. Vidarabine therapy for virus-associated cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bonemarrow transplant.*, 20(6):485-490, 1997.
5. Kisielius, J.J. et al. Standardization of immune electron microscopy in agar for astrovirus detection. *Acta microscopica*, 6(supl.B):170, 1997.
6. Lee, F.K.; Nahmias, A.J.; Stagno, S. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in infants by electron microscopy. *N. Engl. J. Med.*, 299:1266-1270, 1978.
7. Montone, K.T. et al. Neonatal adenovirus infection: a case report with in situ hybridization confirmation of ascending intrauterine infection. *Diagn Cytopathol.*, 12(4):341-344, 1995.
8. Montplaisir, S. et al. Electron microscopy in the rapid diagnosis of cytomegalovirus: ultrastructural observation and comparison of methods of diagnosis. *J. Infect. Dis.*, 125:533-538, 1972.
9. Smith, J.; Coleman, D.V. Electron microscopy of cells showing viral cytopathic effects in Papanicolaou smears. *Acta Cytol.*, 27(6):605-613, 1983.
10. Takahashi, M. *Atlas colorido de citologia do câncer*. 2ª ed. São Paulo: Editora Manole; 1982. p. 459-461.



# Rearranjo de gene da cadeia pesada da imunoglobulina: auxílio diagnóstico em Linfoproliferações B.

Rosângela A. BORIOLI

Instituto Adolfo Lutz – Central – Divisão de Patologia – Seção de Análises Clínicas

Quando uma "stem cell" pluripotente se diferencia para linhagem de células B, o primeiro evento genético é o rearranjo de gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH). Os genes da cadeia pesada da imunoglobulina estão localizados no cromossomo 14 e apresentam aproximadamente 100 genes V ("variable",  $V_H$ ), 30 D ("diversity",  $D_H$ ) e 6 J ("joining",  $J_H$ ). Durante a ontogenia das células B as regiões V, D e J, apresentam duas sucessivas recombinações somáticas,  $D_H-J_H$  e  $V_H-D_H-J_H$ <sup>(1)</sup>. Durante este processo, a enzima desoxirribonucleotidil transferase (TdT), insere nucleotídeos entre os segmentos  $D_H$  e  $J_H$ , produzindo a chamada região N ( $N_H$ ) de seqüência variável. Em seguida, um segundo rearranjo carrega um dos mais de 100 segmentos de gene  $V_H$  para próximo do "locus"  $D_H-N_H-J_H$ ; novamente a TdT insere uma segunda região N ( $N_2$ ) entre  $V_H$  e  $D_H$ , de maneira que o rearranjo determina as regiões  $V_H-N_2-D_H-N_1-J_H$  no ácido desoxirribonucleico (DNA)<sup>2</sup>. A adição de nucleotídeos pela TdT representa um processo, que aumenta a variabilidade das seqüências da imunoglobulina. Existem regiões, que apresentam maior variabilidade denominadas de regiões hipervariáveis, que formam o sítio de ligação com o antígeno e a natureza dos seus radicais determina a especificidade do anticorpo. Estas regiões hipervariáveis são denominadas de Regiões Determinantes de Complementariedade (CDR). Também estão presentes na região V, quatro regiões mais bem conservadas denominadas de regiões "Framework" (FR1, FR2, FR3 e FR4), as quais são interrompidas pelas três regiões CDR (CDR1, CDR2 e CDR3)<sup>3</sup>. As regiões CDR representam uma seqüência única para cada rearranjo de uma imunoglobulina o que traz a possibilidade de se identificar uma célula B individualmente ou uma expansão monoclonal de células B. Portanto, esta seqüência pode ser utilizada como marcador clonal em linfoproliferações<sup>1,5</sup>. A diferenciação entre malignidade

e processo reacional em linfoproliferações nem sempre é um processo simples. A análise molecular, através de rearranjos de gene, pode ser usada para confirmar ou excluir a natureza clonal da proliferação, diferenciar processo reacional de linfoproliferação maligna e auxiliar na detecção de doença residual mínima. Inicialmente as análises para rearranjos de gene foram padronizadas pela técnica de Southern blot. Atualmente, adaptações foram efetuadas para técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual vem sendo preferencialmente escolhida, devido a relativa simplicidade dos protocolos, rapidez na obtenção de resultados, não utilização de radioativo, menor exigência em relação à quantidade de material a ser analisado e aplicabilidade em uma variedade de materiais como: sangue periférico, aspirado de medula óssea e material fixado em parafina<sup>3,3,4</sup>.

## Referências:

1. Bakkus, M.H.C. Ig gene sequences in the study of clonality. *Path Biol.*, 47: 128-147, 1999.
2. Kamel, O.W. et al. Clonal VDJ recombination of the immunoglobulin heavy chain gene by PCR in classical Hodgkin's disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 104: 419-423, 1995.
3. Lehman, C.M. et al. Comparison of PCR with Southern blot hybridization for the routine detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Am. J. Pathol.*, 103: 171-176, 1995.
4. Ling, R. et al. Sensitivity of PCR in detecting monoclonal B cell proliferations. *J. Clin. Pathol.*, 46: 624-627, 1993.
5. Ramasamy, I.; Brisco, A.M. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J. Clin. Pathol.*, 45: 770-775, 1992.
6. Stewart, K.A.; Schwartz, R.S. Immunoglobulin V regions and the B cell. *Blood*, 83: 1717-1730.
7. Van Dongen, J.J.M.; Tettero, W.L.M.I. Analysis of immunoglobulin and T cell receptors genes. *Clinica Chimica Acta*, 198: 1-92, 1991.

## Identidade e qualidade de mortadela, lingüiça e salsicha. Instrução Normativa nº 4

Jussara C. de M. DELLA TORRE

Instituto Adolfo Lutz-Central – Divisão de Bromatologia e Química - Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos

Nos anexos II, III e IV da Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000, ficaram aprovados e entraram em vigor na data de sua publicação (5/4/00) os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha respectivamente, expedido pela Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, considerando necessário instituir medidas que normatizem a indus-

trialização de produtos de origem animal, garantindo condições de igualdade entre os produtores e assegurando a transparência na produção, processamento e comercialização. O objetivo deste regulamento técnico é fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que deverão obedecer os produtos cárneos industrializados denominados mortadela, lingüiça e salsicha. O âmbito de aplicação do presente regulamento refere-se aos

produtos destinados ao comércio nacional e/ou internacional<sup>1</sup>.

#### Definições e classificações dos produtos

Entende-se por Mortadela, o produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas e submetido ao tratamento térmico adequado. A classificação e designação (denominação de venda) são de acordo com a composição das matérias-primas e das técnicas de fabricação: Mortadela, Mortadela Tipo Bologna, Mortadela Italiana, Mortadela Bologna e Mortadela de Carne de Ave.

Entende-se por lingüiça o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado. A classificação é variável de acordo com a tecnologia de fabricação. Trata-se de produto: fresco, cozido, seco curado e/ou maturado, outros. De acordo com a composição das matérias-primas e das técnicas de fabricação as lingüiças classificam-se em Lingüiça Calabresa, Lingüiça Portuguesa, Lingüiça Toscana e Paio. O produto será designado (denominação de venda) de Lingüiça, seguido de denominação ou expressões que o caracterizam, de acordo com a sua apresentação para a venda, tais como: Lingüiça de Carne Bovina, Lingüiça de Carne de Peru, Lingüiça tipo Calabresa, Lingüiça tipo Portuguesa, Lingüiça Mista, Lingüiça de Carne de Frango, outros. Acondicionamentos: envoltórios naturais, envoltórios artificiais, embalagens plásticas ou similares, caixas. Os envoltórios poderão estar protegidos por substâncias glaciaentes aprovadas.

Entende-se por salsicha o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carnes de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, ou artificial por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado. As salsichas poderão ter como processo alternativo o tingimento, depelacção, defumação e a utilização de recheios e molhos. Trata-se de um produto cozido. A classificação é de acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação: Salsicha, Salsicha tipo Viena, Salsicha tipo Frankfurt, Salsicha Frankfurt, Salsicha Viena, Salsicha de Carne de Ave. A designação ou denominação de venda será Salsicha, e opcionalmente poderá ter as seguintes denominações isoladas ou combinadas de acordo com a sua apresentação para a venda: Salsicha, Salsicha Viena, Salsicha Frankfurt, Salsicha de Carne de Ave, Salsicha de Peru, outras.

As características sensoriais das mortadelas, lingüiças e salsichas são definidas de acordo com o processo de obtenção, onde a textura, a cor, o sabor e o odor devem ser característicos. Os aditivos e os coadjuvantes de tecnologia devem estar de acordo com o regulamento específico vigente - Portaria 1004, de 11/12/98<sup>2</sup>.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 tem-se resumido as características físico-químicas para as diferentes classificações de mortadela, lingüiça e salsicha respectivamente, quanto aos teores máximos de umidade, gordura, amido, carboidratos totais, cálcio base seca (BS), teores mínimos de proteína e as possibilidades de uso de matérias-primas como Carne Mecanicamente Separado (CMS), miúdos comestíveis (estômago, coração, língua, fígado, rins e miolos), pele e tendões.

**Tabela 1.** Características de Identidade e Qualidade de Mortadela (Instrução Normativa nº 4 de 31/3/2000)

PRODUTOS	PORCENTAGEM								
	Umidade (máx)	Proteína (mín)	Gordura (máx)	Amido (máx)	Carboid. Totais <sup>(1)</sup> (máx)	Cálcio BS (máx)	CMS <sup>(2)</sup> (máx)	Prot.não cárnea <sup>(3)</sup> (máx)	Miúdos <sup>(4)</sup> (máx)
Mortadela <sup>(5)</sup>	65	12	30	5	10	0,9	60	4	10
Mortadela tipo Bologna <sup>(6)</sup>	65	12	30	5	10	0,3	20	4	10
Mortadela Italiana <sup>(7)</sup>	65	12	35	0	3	0,1	0	4 <sup>(3)</sup>	0
Mortadela Bologna <sup>(8)</sup>	65	12	35	0	3	0,1	0	4 <sup>(3)</sup>	0
Mortadela de Carne de Ave <sup>(9)</sup>	65	12	30	5	10	0,6	40	4	5

BS = Base seca

<sup>(1)</sup> A somatória de amido máximo e açúcares totais (carboidratos totais) não deverá ultrapassar 3% ou 10%.

<sup>(2)</sup> CMS = Carne Mecanicamente Separada (espécie animal) Composição: Proteína (mín.) 12% Gordura (máx.) 30% Cálcio (máx.) 1,5% (BS) Índice de peróxido (máx) 1 mEq KOH/Kg de gordura

<sup>(3)</sup> Permite-se a adição de 4% (máx) de proteínas não cárneas (vegetal e/ou animal), como proteína agregada. Não será permitida a adição de proteínas não cárneas nas mortadelas Bologna e Italiana, exceto as proteínas lácteas.

<sup>(4)</sup> Miúdos e vísceras comestíveis (estômagos, coração, língua, fígado, rins, miolos e medula), pele e tendões. Até 5% de miúdos comestíveis de aves (fígado, moela e coração) para Mortadela de Carne de Ave.

<sup>(5)</sup> Mortadela: carnes de diferentes espécies de animais de açougue, CMS, miúdos e gorduras.

<sup>(6)</sup> Mortadela tipo Bologna: carne bovina e/ou suína e/ou ovina, CMS, miúdos e gorduras.

<sup>(7)</sup> Mortadela Italiana: porções musculares de carnes de diferentes espécies de animais de açougue e toucinho. O toucinho em cubos deverá ser aparente ao corte. Não é permitido adição de amido.

<sup>(8)</sup> Mortadela Bologna: porções musculares de carnes bovina e/ou suína e toucinho, embutida na forma arredondada. O toucinho em cubos deverá ser aparente ao corte. Não é permitido adição de amido.

<sup>(9)</sup> Mortadela de Carne de Ave: carne de ave, CMS, miúdos de aves e gorduras.

**Tabela 2.** Características de Identidade e Qualidade de Lingüiças (Instrução Normativa nº 4 de 31/3/2000)

PRODUTOS	PORCENTAGEM						
	Umidade (máx)	Proteína (mín)	Gordura (máx)	Amido (máx)	Cálcio BS (máx)	CMS <sup>(1)</sup> (máx)	Prot. não carne <sup>(2)</sup> (máx)
Lingüiças Frescas	70	12	30	0	0,1	0	2,5
Lingüiças Cozidas	60	14	35	0	0,3	20	2,5
Lingüiças Dessecadas	55	15	30	0	0,1	0	2,5

BS = Base seca

<sup>(1)</sup> É proibido o uso de CMS (Carne Mecanicamente Separada) em Lingüiças frescas (cruas e dessecadas). O uso de CMS em Lingüiças cozidas fica limitado em 20%. Nas Lingüiças tipo calabresa, tipo portuguesa e paio, que são submetidas ao processo de cozimento, será permitido a utilização de até 20% de CMS, desde que seja declarado no rótulo e constar na relação de ingredientes. A CMS utilizada poderá ser substituída por carne de diferentes espécies de animais de açougue, até o limite máximo de 20%.

<sup>(2)</sup> Permite-se a adição de 2,5% (máx) de proteínas não cárneas (vegetal e/ou animal), como proteína agregada. Não sendo permitida a sua adição nas Lingüiças toscana, calabresa, portuguesa, blumenau e colonial.

**Caracterização**

- 1 Lingüiça Calabresa: exclusivamente carnes suína, ingredientes, curado, estufagem/cozimento ou não, defumação opcional, sabor picante característico de pimenta calabresa.
- 2 Lingüiça Portuguesa: exclusivamente carnes suína, ingredientes, curado, calor com defumação, sabor acentuado de alho e apresentação na forma de ferradura.
- 3 Lingüiça Toscana: exclusivamente carnes suína, ingredientes, cru e curado, gordura suína.
- 4 Paio: carne suína e bovina (máx.20%), ingredientes, curado, tripa natural ou artificial comestível, calor com defumação.

**Tabela 3.** Características de Identidade e Qualidade de Salsicha (Instrução Normativa nº 4 de 31/3/2000)

PRODUTOS	PORCENTAGEM								
	Umidade (máx)	Proteína (mín)	Gordura (máx)	Amido (máx)	Carboid. Totais <sup>(1)</sup> (máx)	Cálcio BS (máx)	CMS <sup>(2)</sup> (máx)	Prot. não carne <sup>(3)</sup> (máx)	Miúdos <sup>(4)</sup> (máx)
Salsicha <sup>(5)</sup>	65	12	30	2	7	0,9	60	4	10
Salsicha Viena /Salsicha Frankfurt <sup>(6)</sup>	65	12	30	2	7	0,1	0	4 <sup>(7)</sup>	0
Salsicha tipo Viena/Sals. tipo Frankfurt <sup>(7)</sup>	65	12	35	2	7	0,6	40	4	10
Salsicha de Carne de Ave <sup>(8)</sup>	65	12	30	2	7	0,6	40	4	10

BS = Base seca

<sup>(1)</sup> A somatória de amido máximo e açúcares totais (carboidratos totais) não deverá ultrapassar 7%.

<sup>(2)</sup> CMS = Carne Mecanicamente Separada (espécie animal).

<sup>(3)</sup> Permite-se a adição de 4% (máx) de proteínas não cárneas (vegetal e/ou animal), como proteína agregada. Não será permitida a adição de proteínas não cárneas nas salsichas Viena e Frankfurt, exceto as proteínas lácteas.

<sup>(4)</sup> Miúdos e vísceras comestíveis (estômago, coração, língua, fígado, rins, miolos e medula), pele e tendões ficam limitados no percentual de 10%, utilizados de forma isolada ou combinada, exceto nas Salsichas Viena e Frankfurt. Miúdos comestíveis de aves (fígado, moela e coração) para Salsicha de Carne de Ave.

<sup>(5)</sup> Salsicha: carnes de diferentes espécies de animais de açougue, CMS, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue e gorduras.

<sup>(6)</sup> Salsicha Viena / Salsicha Frankfurt: porções musculares de carnes bovina e/ou suína e gorduras.

<sup>(7)</sup> Salsicha tipo Viena / Salsicha tipo Frankfurt: carnes bovina e/ou suína, CMS, miúdos comestíveis de bovino e/ou suíno e gorduras.

<sup>(8)</sup> Salsicha de Carne de Ave: carne de ave, CMS de ave e gorduras.

**Referências:**

1. Brasil. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 4, 31 de mar. 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial**, Brasília, 05 abr. 2000, Seção 1, p.6-10.
2. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria nº 1004, 11 de dez. 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8. Carnes e Produtos Cárneos". **Diário Oficial**, Brasília, 14 dez. 1998, nº 239-E, Seção 1, p.28-32.

# Identidade e qualidade de produtos cárneos

## Instruções normativas nº 20, 21 e 22

Jussara C. de M. DELLA TORRE

Instituto Adolfo Lutz Central – Divisão de Bromatologia e Química – Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto

Conforme consta dos anexos das Instruções Normativas nº 20, 21 e 22 de 31 de julho de 2000, foram aprovados e entraram em vigor na data de sua publicação (3/8/00) os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, Apresuntado, Fiambre, Hambúrguer, Kibe, Presunto Cozido (Instrução Normativa nº 20), Patê, Bacon ou Barriga Defumada, Lombo Suíno (Instrução Normativa nº 21), Copa, Jerked Beef, Presunto tipo Parma, Presunto Cru, Salame, Salaminho, Salame tipo Alemão, Salame tipo Calabrês, Salame tipo Friolano, Salame tipo Napolitano, Salame tipo Hamburguês, Salame tipo Italiano, Salame tipo Milano, Lingüiça Colonial e Pepperoni (Instrução Normativa nº 22), expedido pela Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, considerando necessário instituir medidas que normatizem a industrialização de produtos de origem animal, garantindo condições de igualdade entre os produtores e assegurando a transparência na produção, processamento e comercialização. O objetivo destes regulamentos técnicos foi fixar a identidade e as caracte-

rísticas mínimas de qualidade que deverão obedecer os produtos cárneos industrializados. O âmbito de aplicação do presente regulamento refere-se aos produtos cárneos destinados ao comércio nacional e/ou internacional<sup>1,2,3</sup>.

As características sensoriais dos produtos cárneos são definidas de acordo com os processos de obtenção, onde a textura, a cor, o sabor e o odor devem ser característicos. Os aditivos e os coadjuvantes de tecnologia devem estar de acordo com o regulamento específico vigente – Portaria 1004, de 11/12/98<sup>4</sup>.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 tem-se resumido as características físico-químicas para as diferentes classificações dos produtos cárneos acima citados, quanto aos teores máximos de atividade de água (Aw), umidade, gordura, amido, carboidratos totais, cálcio base seca, teores mínimos de proteína e as possibilidades de uso de matérias-primas como a carne mecanicamente separada (CMS) e proteínas não-cárneas vegetal e/ou animal como as proteínas de soja e proteínas lácteas, as mais utilizadas.

**Tabela 1.** Características de Identidade e Qualidade de Produtos Cárneos (Instrução Normativa nº 20 de 31/7/2000)

PRODUTOS CÂRNEOS	PORCENTAGEM							
	Umidade (máx)	Proteína (mín)	Gordura (máx)	Amido (máx)	Carboid. Totais <sup>(1)</sup> (máx)	Cálcio Base Seca (máx)	CMS <sup>(2)</sup> (máx)	Prot. não cárneas <sup>(3)</sup> (máx)
Almôndega crua	-	12	18	-	10	0,1	0	4,0
Almôndega cozida	-	12	18	-	10	0,45	30	4,0
Apresuntado	75	13	12	2	5	-	-	2,5
Fiambre	70	12	-	5	10	0,45	30	2,5
Hambúrguer cru	-	15	23	-	3	0,1	0	4,0
Hambúrguer cozido	-	15	23	-	3	0,45	30	4,0
Kibe	-	11	-	-	-	0,1	-	4,0
Presunto cozido superior <sup>(4)</sup>	-	16,5*	-	-	1	-	-	1,0 <sup>(5)</sup>
Presunto cozido <sup>(5)</sup>	-	14*	-	-	2	-	-	2,0

<sup>(1)</sup> A somatória de amido máximo e açúcares totais (carboidratos totais) não deverá ultrapassar 1%, 2%, 3%, 5% ou 10%

<sup>(2)</sup> CMS = Carne Mecanicamente Separada (espécie animal)

<sup>(3)</sup> Permite-se a adição de proteínas não cárneas (vegetal e/ou animal), como proteína agregada. Quando se tratar do produto Presunto cozido superior é proibida a utilização de qualquer proteína que não aquela proveniente da massa muscular do pernil, exceto o caseinato de sódio no limite máximo de 1,0%

<sup>(4)</sup> Presunto cozido superior: U/P (máx.) = 4,5

<sup>(5)</sup> Presunto cozido: U/P (máx.) = 5,35

\* O teor mínimo de proteína deve ser obtido a partir do produto isento de gordura

### Definições e Classificações (resumo)

**Almôndega:** obtido a partir da carne moída de uma ou mais espécies de animais de açougue, moldada na forma arredondada. Produto cru, semi-frito, frito, cozido ou esterilizado.

- Apresentado:** obtido a partir de recortes e/ou cortes e recortes de massas musculares dos membros anteriores e/ou posteriores de suínos (carne de pernil e/ou paleta de suíno). Produto cozido
- Fiambre:** obtido de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, miúdos comestíveis (máx. 10%). Faculta-se o uso de vegetais ou outro ingrediente na composição do produto (recheios: pistache, queijo, salame, etc.). Outras denominações: Lanches, Pão de Carne, outros. Produto cozido
- Hambúrguer:** obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo. Produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado. Faculta-se o uso de recheios (vegetais, queijos, outros)
- Kíbe:** obtido de carne bovina, ovina ou outra espécie animal, moída, adicionado com trigo integral. Produto cru, frito ou assado. Faculta-se o uso de recheios
- Presunto cozido:** obtido exclusivamente com o pernil de suínos, desossado. Produto cozido

**Tabela 2.** Características de Identidade e Qualidade de Produtos Cárneos (Instrução Normativa nº21 de 31/7/2000)

PRODUTOS CÁRNEOS	PORCENTAGEM					
	Umidade (máx)	Proteína (mín)	Gordura (máx)	Amido (máx)	Carboid. Totais <sup>(1)</sup> (máx)	Prot. não cárneas <sup>(2)</sup> (máx)
Patê	70	8	32	10	10	3,0
Bacon e Barriga defumada <sup>(3)</sup>	-	-	-	-	-	2,0
Lombo tipo Canadense	72	16	8	-	1	2,0
Lombo cozido	72	16	8	-	1	2,0
Lombo curado dessecado	45	20	10	-	1	2,0
Lombo temperado	75	16	-	-	2	2,0

<sup>(1)</sup> A somatória de carboidratos totais (máx.) e amido (máx.) não deverá ser superior a 10%

<sup>(2)</sup> Permite-se a adição de proteínas não cárneas (vegetal e/ou animal), como proteína agregada

<sup>(3)</sup> Devido a natureza anatômica da matéria-prima, os parâmetros físico-químicos do produto são dispensáveis pela sua alta variabilidade, exceto os previstos na Legislação de Aditivos Intencionais

#### Definições e Classificações (resumo)

**Patê ou Pasta:** obtido a partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, das diferentes espécies de animais de açougue, transformados em pasta. Poderão apresentar fragmentos de tecido muscular e/ou vegetais (amêndoas, pistaches, frutas, azeitona, etc.) na forma triturada ou em pedaços. Deverão conter no mínimo 30% da matéria-prima que o designe, exceto o de fígado cujo limite mínimo poderá ser de 20%. O patê com teor de umidade maior que 60%, deverá ser compulsoriamente pasteurizado. Produto cozido, pasteurizado ou esterilizado.

**Bacon:** obtido do corte da parede torácico-abdominal dos suínos, que vai do esterno ao púbis, com ou sem costela, com ou sem pele. Produto defumado, cozido ou não. O produto poderá ser obtido com os músculos adjacentes, sem osso, permitindo-se, neste caso, a expressão "Especial" ou "Extra" na sua designação de venda.

**Barriga Defumada:** obtido da porção abdominal (parte ventral) dos suínos. Produto defumado, cozido ou não.

**Lombo:** obtido do corte da região lombar dos suínos, ovinos e caprinos.

**Lombo tipo Canadense:** obtido a partir do corte de carcaças de suínos denominado de lombo, em peça íntegra ou parcial, defumado ou não.

**Lombo Cozido:** obtido a partir do corte de carcaças denominado de lombo, inteiro ou em pedaços, adequado cozimento, defumado ou não.

**Lombo Temperado:** obtido a partir de corte de carcaças denominado de lombo, inteiro ou em pedaços.

**Lombo Curado Dessecado:** obtido a partir do corte de carcaças denominado de lombo, adicionado de sais de cura, defumado ou não.

**Carré Temperado (Kassler):** obtido a partir do corte de carcaças denominado de lombo com osso, inteiro ou cortado em pedaços, defumado ou não.

**Tabela 3.** Características de Identidade e Qualidade de Produtos Cárneos (Instrução Normativa nº22 de 31/7/2000)

PRODUTOS CÁRNEOS	PORCENTAGEM						Corte cárneo / espécie
	Av (máx)	Umid. (máx)	Gord. (máx)	Proteína (mín)	Carboid. Totais (máx)	Moagem Granulometria (mm)	
Copa*	0,90	40	35	20	-	-	Corte íntegro da nuca ou sobrepaleta de suíno
Carne bov. salgada curada dessecada ou Jerked Beef	0,78	55	-	-	-	-	Carne bovina
Presunto tipo Parma*	0,92	-	15	27	-	-	Pernil íntegro suíno sem pata (mínimo 9 Kg)
Presunto cru*	0,92	-	20	27	-	-	Pernil ou corte do pernil de suínos
Salame*	0,92	40	35	20	1,5	-	Carnes suínas ou suínas (mín.60%) e bovinas, toucinho
Salaminho*	0,90	35	32	25	1,5	6 a 9	Carnes suínas ou suínas (mín.60%) e bovinas, toucinho
Salame tipo Alemão*	0,92	40	35	25	1,5	3 a 6	Carne exclusivamente suína, toucinho
Salame tipo Calabres*	0,90	35	35	25	1,5	10 a 15	Carnes suínas ou suínas (mín.60%) e bovinas, toucinho
Salame tipo Friolano*	0,90	35	30	25	1,5	6 a 9	Carne exclusivamente suína, toucinho
Salame tipo Napolitano*	0,91	35	35	23	1,5	8 a 12	Carnes suínas ou suínas (mín.60%) e bovinas, toucinho
Salame tipo Hamburguês*	0,92	40	35	23	1,5	3 a 6	Carnes suínas ou suínas (mín.50%) e bovinas, toucinho
Salame tipo Italiano*	0,90	35	32	25	1,5	6 a 9	Carnes suínas ou suínas (mín.60%) e bovinas, toucinho
Salame tipo Milano*	0,90	35	35	23	1,5	3 a 6	Carnes suínas ou suínas (mín.60%) e bovinas, toucinho
Lingüiça Colonial*	-	-	30	18	1,5	Variável	Carne exclusivamente suína, toucinho
Pepperoni*	0,92	38	40	20	1,5	3 a 6	Carnes suínas ou suínas (mín.50%) e bovinas, toucinho

\* A presença de "mofo" característicos, é consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação

#### Definições e Classificações (resumo)

- Copa:** produto curado, maturado, dessecado, defumado ou não. Cor: de tonalidade avermelhada, com gordura esbranquiçada entremeada, podendo apresentar pontos de condimentos visíveis ao corte.
- Jerked Beef:** produto cru, curado, maturado e dessecado. Matéria mineral (máx.): 18,3%.
- Presunto tipo Parma:** produto salgado e dessecado por um período mínimo de 10 meses.
- Presunto cru:** produto cru, curado ou não, maturado, defumado ou não e dessecado.
- Salame:** produto cru, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado.
- Salaminho:** produto curado, defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado. O produto é caracterizado por ser embutido em tripas com calibre até 50 mm.
- Salame tipo Alemão:** produto curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado.
- Salame tipo Calabres:** produto curado, fermentado, maturado e dessecado. Ingrediente obrigatório pimenta calabresa.
- Salame tipo Friolano:** produto curado, fermentado, defumado ou não, maturado e dessecado.
- Salame tipo Napolitano:** produto curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. Ingredientes obrigatórios pimenta do reino quebrada ou em grãos e alho.
- Salame tipo Hamburguês:** produto curado, defumado, fermentado, maturado e dessecado.
- Salame tipo Italiano:** produto curado, defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado.
- Salame tipo Milano:** produto curado, defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado.
- Lingüiça Colonial:** produto curado, que sofre um processo rápido de fermentação, defumado e dessecado. Embutido em envoltório natural.

**Pepperoni:** produto apimentado curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. Poderá sofrer processo de dessecação rápida em estufas apropriadas até que a temperatura no centro do mesmo atinja 62°C, mantendo-se as características de um produto maturado e dessecado. Ingrediente obrigatório páprica (pimentão vermelho picante). Permite-se a adição de proteínas não cárneas no teor máximo de 2%, na forma de proteína agregada.

#### Referências:

1. Brasil. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 20 de 31 de julho 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresentado, de Fimbre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido. **Diário Oficial**, Brasília, nº 149, 03 ago. 2000, Seção 1, p.7-12
2. Brasil. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 21 de 31 de julho 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Patê, de Bacon ou Barriga Defumada e de Lombo Suíno. **Diário Oficial**, Brasília, nº 149, 03 ago. 2000, Seção 1, p.12-15.
3. Brasil. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colonial e Pepperoni. **Diário Oficial**, Brasília, nº 149, 03 ago.2000, Seção 1, p.15-28.
4. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria nº 1004 de 11 de dez. 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8. Carnes e Produtos Cárneos". **Diário Oficial**, nº 239-E, Brasília, 14 dez.1998, Seção 1, p.28-32.

## Regulamentos e normas para aflatoxinas em alimentos - CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões Para Alimentos), Mercosul, Codex Alimentarius e CE (Comissão Européia).

Maria Ângela P. ZORZETTO, Myrna SABINO

Instituto Adolfo Lutz – Central – Divisão de Bromatologia e Química – Seção de Química Biológica

É evidente que alimentos contaminados com substâncias tóxicas são impróprios para o consumo humano e animal. Considerando que as micotoxinas são contaminantes naturais e que, em muitos casos, não podem ser completamente eliminadas sem interditar o alimento susceptível a contaminação, os órgãos oficiais de saúde pública são obrigados a chegar a um compromisso de decisão reguladora em face da informação limitada sobre o efeito tóxico, ou outros efeitos adversos de uma micotoxina. Os regulamentos em vigor nos países com os quais existe um intercâmbio comercial tem que ser considerado. Para enfrentar a tarefa de regulamentação são necessárias escolhas de prioridades. Até os países desenvolvidos, ante a estas tarefas de atualização de legislação, estão adotando critérios seletivos.

A legislação em vigor no Brasil para aflatoxinas ainda é a **Resolução 34/76** da antiga CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) do Ministério da Saúde que estabelece em 30 µg/kg (ppb) a soma de Aflatoxina B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em alimentos em geral.

Os países membros do MERCOSUL se reuniram para harmonizar as normas de alimentos e o que se refere as aflatoxinas foi discutido por um Grupo Ad Hoc, integrante do Sub Grupo de Trabalho III – Comissão de Alimentos.

O presente Regulamento (que está para ser internalizado) **Resolução GMC nº 56/94 MERCOSUL** estabelece os Limites Máximos Tolerados de aflatoxinas em leite cru, leite em pó, amendoim, pasta de amendoim, milho em grão e farinha ou sêmola de milho para consumo humano, bem como os métodos de amostragem e os métodos analíticos correspondentes (Tabela 1).

Para as culturas não citadas na Res.56/94 MERCOSUL continua valendo a **RES. 34/76 da CNNPA** do Ministério da Saúde.

O Ministério da Agricultura internalizou a Resolução MERCOSUL na Portaria nº 183 de 21/03/96.

Com relação ao **CODEX Alimentarius**, houve mudanças nos limites de AFM<sub>1</sub> no leite (de 0,5 µg/L para 0,05µg/L). Para AFB<sub>1</sub> não está havendo consenso quanto ao limite de 15 µg/kg em amendoim. Alguns países apóiam sua redução para 10 µg/kg. Várias delegações apoiaram a necessidade de bases científicas em função da amostragem que sustentem a necessidade da redução do nível para 10 µg/kg.

Membros da **Comissão Européia** através de um regulamento da Comissão Européia (EC No.1525/98), modificou a Comissão de Regulamentação nº 194/97 de 31 de janeiro de 1997, estabelecendo níveis máximos para certos contaminantes

em alimentos, e uma divisão da Comissão Diretiva (98/53/CE) estabeleceu sobre métodos de amostragem e critérios para métodos de análises para um controle oficial de níveis de aflatoxinas em alimentos, publicado pela **Comissão Europeia** em 16 de julho de 1998, L201/93 e L201/101, respectivamente (Tabela 2).

Foram fixados níveis máximos permitidos para aflatoxina B<sub>1</sub> e o total de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) em diferentes produtos.

Descontaminação de produtos por tratamento químico é proibido bem como mistura de produtos contaminados com produtos de boa qualidade com a finalidade de chegar a níveis permitidos para o consumo humano.

Quanto às outras micotoxinas, discussões estão sendo iniciadas: para zearalenona, ocratoxina A e fumonisina, documentos foram preparados para discussões enquanto que os tricotecenos estão sendo estudados e consta da lista de prioridades do JECFA (Joint Expert Contaminantes Food Additives).

Quanto à patulina, algumas discussões foram realizadas tomando como base um documento preparado pela França. Pelos dados apresentados houve uma recomendação para que o limite de 50 µg/L (suco de maçã), já utilizado por alguns países permaneça e para aqueles países onde o consumo de suco de maçã é elevado principalmente por crianças, foi sugerido limite de 25 µg/L. Entretanto nada está definido.

**Tabela 1.** Mercosul – limites máximos tolerados

Alimento	Aflatoxinas	
	Total (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> ) µg/kg	M <sub>1</sub> µg/L ou µg/kg
<b>Leite</b>		
- Leite fluido	-	0,5
- Leite em pó		5,0
<b>Milho</b>		
- Milho em grão (inteiro, partido, amassado)	20	-
- Farinhas ou sêmolos de milho	20	-
<b>Amendoim</b>		
- Amendoim (sem casca, com casca, cru ou torrado)	20	-
- Amendoim em pasta (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim)	20	-

**Tabela 2.** Comunidade europeia – limites máximos tolerado

Alimento	Aflatoxinas		
	B <sub>1</sub> (µg/kg)	Total (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> ) (µg/kg)	M <sub>1</sub> (µg/L)
<b>amendoim, nozes, frutas secas</b> para consumo humano ou ingrediente para alimentos	2	4	
<b>amendoim</b> sujeitos à separação ou outro tratamento físico	8	15	
<b>nozes e frutas secas</b> sujeitas à separação ou outro tratamento físico	5	10	
<b>cereais e produtos processados</b> destinados ao consumo humano direto ou como ingrediente para alimentos	2	4	
<b>cereal</b> sujeito à separação ou outro tratamento	não há limite específico previsto para antes de 1 de julho de 1999		
<b>leite fluido</b> e leite para fabricação de produtos a base de leite e leite tratado com aquecimento	-	-	0,05

**Referências:**

1. MERCOSUL/GMC/RES.No.56/94 - Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas.
2. CODEX: 30ª Reunião do Comitê CODEX sobre Aditivos, Alimentos e Contaminantes. Haya-Holanda.
3. **Mycotoxicology Newsletter and International Forum for Mycotoxins.** Editor - Dr. Angelo Visconti, Institute of Toxins and Mycotoxins, CNR - Viale Einaudi 51, 70125 Bari, Italy- Volume IV, No. 2 - August 1998.



## Dispensa da obrigatoriedade de registro de embalagens

Lúcia T. F. MURATA, Maria Cecília D. NUNES, Maria Rosa da S. de ALCÂNTARA, Neus S. PASCUET, Eliani R. RIBEIRO, Kátia C. da SILVA, César BRAGHINI NETO – Instituto Adolfo Lutz – Central – Divisão de Bromatologia e Química – Seção de Embalagens e Correlatos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, publicou no Diário Oficial da União de 16 de março de 2000 Seç. 1 pág. 15 – 23, a Resolução Nº 23 de 15 de março de 2000, que dispõe sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos.

Este manual se aplica a todos os setores envolvidos com o trâmite de processos de registro ou dispensa da obrigatoriedade de registro de alimentos, aditivos, coadjuvantes de tecnologia e embalagens nacionais e importados.

Os produtos do Anexo I desta resolução, onde se incluem as embalagens, estão dispensados de registro, enquanto que os produtos do Anexo II, onde estão compreendidas as embalagens recicladas devem ser registrados no órgão competente do Ministério da Saúde.

O objetivo da publicação desta Resolução pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária visa reduzir a burocracia exigida para o registro de alimentos e embalagens com o intuito de modernizar sua atuação em relação às normas e padrões técnicos, sendo mais exigente em suas ações de Inspeção Sanitária e análises de controle.

A dispensa deste registro, porém, não implica que as embalagens não devam mais atender aos critérios de qualidade, estabelecidos na legislação vigente. Ao contrário, com essa decisão a Agência atribui exclusivamente ao produtor de embalagens a responsabilidade de garantir a qualidade e a segurança dos produtos que fabricam, o que passa necessariamente por um controle sanitário eficiente da produção, pelo atendimento aos critérios de identidade e qualidade estabelecidos na legislação de embalagens e pela demonstração efetiva de responsabilidade técnica no desenvolvimento de novos produtos.

Visando comprovar que mesmo sem a obrigatoriedade de registro os fabricantes de embalagens continuariam mantendo o interesse em analisar seus produtos a fim de verificar se eles estão de acordo com a legislação vigente, fizemos um levantamento do número de amostras analisadas em nosso laboratório, antes e depois da publicação da referida resolução.

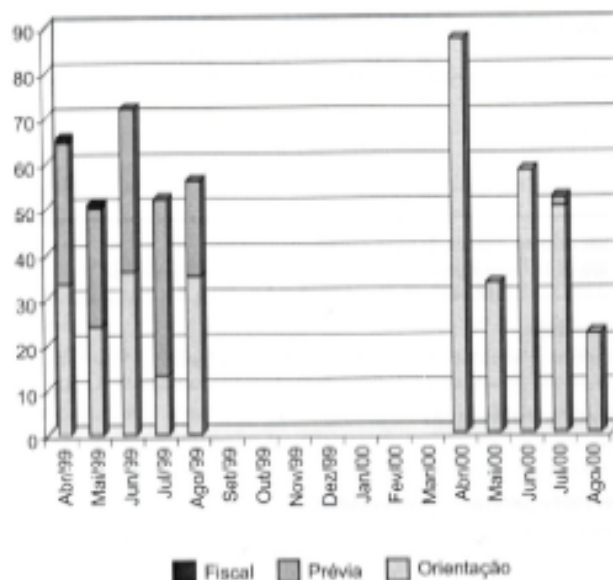
O Gráfico 1 mostra o número de amostras analisadas no período de abril a agosto de 1999, quando o registro era obrigatório, e o número de amostras analisadas no período de abril a agosto de 2000, quando da dispensa da obrigatoriedade de registro.

No período compreendido no Gráfico, foram analisadas 268 amostras em 1999 e 252 amostras em 2000. Nota-se ainda, neste Gráfico, que o número de análises fiscais e de controle continua muito baixo ou inexistente, pois apenas foram realizadas duas análises fiscais neste período. Este fato pode ser explicado, talvez, pela dificuldade maior na coleta de

amostras de embalagens, para análise, pela fiscalização, pois, ao contrário de outros setores como o de alimentos, onde as amostras podem ser colhidas no próprio supermercado, as embalagens devem ser virgens, e portanto colhidas diretamente na fonte produtora. Isto, entretanto não justifica o baixo número de análises fiscais e de controle, pois segundo a legislação citada, a partir da dispensa da obrigatoriedade de registro, este procedimento de fiscalização seria intensificado.

Diante destes dados, para um contínuo aperfeiçoamento das ações de Vigilância Sanitária, está sendo desenvolvido, em conjunto, um programa de monitoramento da qualidade das embalagens, como parte integrante da nova visão de controle permanente de produtos.

GRÁFICO 1



### Referências:

1. Brasil, Leis, decretos, etc. Resolução 23 de 15 mar. 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 16 mar. 2000. Seção 1, p.15-23. Dispõe sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos.
2. Garcia, E.E.C. Dispensa do registro de embalagens. **Informativo CETEA**, Campinas:V.12, Nº 2, p.9-11, 2000.
3. Santos, C.F. Registro de Embalagens – Proposta de Modernização. In: Seminário Internacional: Legislação de Embalagem & Comércio. Campinas, SP, **Anais...**, 2000.

## Embalagem X Reciclagem X Meio Ambiente

Lúcia T. F. MURATA, Maria Cecília D. NUNES, Maria Rosa da S. de ALCÂNTARA, Neus S. PASCUET, Kátia C. da SILVA, Eliani R. RIBEIRO, César BRAGHINI NETO

Instituto Adolfo Lutz – Central – Divisão de Bromatologia e Química – Seção de Embalagens e Correlatos

Na intensificação dos debates sobre o meio ambiente, embalagens e indústrias de embalagens têm se tornado um dos principais alvos de ataque, não somente por grupos de defesa ambiental, mas também por legisladores, uma vez que as embalagens são consideradas particularmente prejudiciais para o meio ambiente.

Esta concepção se deve principalmente ao volume de resíduo sólido representado pelas embalagens uma vez que a quase totalidade dos produtos que consumimos são embalados. A participação crescente das embalagens no resíduo sólido urbano está relacionada ao aumento da população, ao maior número de produtos industrializados, à melhoria no padrão de vida e ao aumento no consumo. É importante lembrar porém, que, em princípio, as embalagens não diferem de outros bens materiais exceto porque têm seu ciclo de vida muito mais curto.

A embalagem tem um impacto ambiental positivo, protegendo alimentos e bens de consumo durante a estocagem e distribuição e tem um impacto ambiental negativo, uma vez que consome matérias-primas e energia na sua confecção. Se por um lado contribui para a redução das perdas de alimentos e bens de consumo, por outro é descartada como resíduo e se acumula nos lixos urbanos.

Para se tomar decisões quanto à redução do impacto negativo da embalagem é essencial que se tenha uma visão do sistema completo e dos requisitos de proteção do produto que a embalagem vai conter. O momento correto para reduzir o impacto negativo da embalagem é no seu projeto, pois é nesta etapa que se pode fazer uma combinação balanceada da sua função e do seu impacto ambiental.

Na legislação ambiental européia, o setor de embalagens é uma das áreas mais importantes incluindo indústrias, distribuidores, revendedores e consumidores. O objetivo dessa legislação é minimizar o impacto ambiental dos resíduos de embalagem através das seguintes medidas: redução da quantidade de materiais utilizados, incentivo à recuperação e reciclagem dos materiais e minimização do volume de resíduos encaminhados para os aterros. Ou seja, esta legislação segue a hierarquia da gestão do resíduo sólido urbano que é: evitar, reduzir, reciclar, tratar e aterrar.

Esta legislação – Diretiva 94/62/EC – cobre todos os tipos de embalagens existentes no mercado e todo o descarte (lixo) proveniente destas embalagens.

Visando o impacto ambiental, as embalagens devem ser fabricadas de forma que seu volume e peso contenham as quantidades mínimas necessárias para manter o nível de segurança, higiene e adequação do produto embalado e do consumidor.

A presença de metais nocivos e substâncias nocivas, deve ser limitada tendo em vista o seu impacto ambiental, particularmente, com relação à sua presença em emissões ou cinzas, quando da incineração de embalagens, ou na lixívia quando a embalagem é disposta em aterros. É essencial: a redução da toxicidade do lixo de embalagens; prevenir a adição de metais

pesados nas mesmas e assegurar que tais substâncias não sejam liberadas no meio ambiente. Estes princípios devem ser seguidos também, durante o processo de fabricação, tendo em vista a segurança e saúde ocupacional.

Esta diretiva estipula a cada cinco anos prazos e porcentagens para a redução e reciclagem das embalagens. Propõe ainda que seus objetivos sejam matéria para campanhas de informação pública em geral e dos fabricantes de embalagens em particular.

As metas desta diretiva até 30/06/2001 são: minimização de substâncias nocivas – ex.: metais pesados <100 ppm; valorização de 50 a 60% dos resíduos de embalagem; reciclagem de 25 a 45% dos resíduos de embalagem; reciclagem de no mínimo 15% de cada tipo de material.

Nos Estados Unidos, a auto-regulamentação, programas voluntários e restrições técnicas sobre aterros, são fixados pela EPA – Environmental Protection Agency – que através do EPA Wastewise Program tem como metas a redução, a coleta para reciclagem e a compra ou fabricação de produtos com conteúdo de reciclado. Este programa pretende atingir uma média nacional de 25% para reciclagem; além de possuir mais de 7000 programas de coleta seletiva e mais de 300 locais de compostagem.

No Brasil, a situação em relação ao gerenciamento do resíduo sólido urbano, ainda é bastante precária. Segundo dados do IBGE (1991) 63,7% do resíduo sólido é coletado. Porém, somente 10% deste montante destinam-se aos aterros sanitários, o restante é jogado indiscriminadamente, queimado sem controle ou enterrado. Do coletado, 76% são dispostos em lixões sem qualquer infra-estrutura para o controle de poluentes, quer seja do chorume ou dos gases gerados na decomposição da matéria orgânica, havendo grande risco de contaminação ambiental da região envolvida. O chorume compromete lençóis freáticos, enquanto os gases estão associados principalmente ao efeito estufa ou à contaminação com compostos com implicações tóxicas ou carcinogênicas.

Do resíduo sólido urbano gerado, 30 a 40% é composto por materiais recicláveis, com uma maior contribuição dos materiais celulósicos, seguidos pelos plásticos, metais e vidro. Esta fração do resíduo sólido tem propiciado o surgimento de indústrias de reciclagem próximas às grandes cidades.

Só a cidade de São Paulo produz cerca de 12500 ton/dia de resíduo sólido, dos quais cerca de 30% são materiais de embalagem. Para minimizar o volume de embalagem destinado ao aterro, a reciclagem vem sendo desenvolvida em diversas cidades do País. Para que a reciclagem se efetive é necessário que seja feita a separação dos materiais. Porém, para um país que possui cerca de 5000 municípios, menos de 100 prefeituras dispõem de sistema de coleta seletiva de lixo, dos quais quase 50% se localizam em São Paulo e Rio Grande do Sul.

Além disso, as áreas para implantação de aterros sanitários estão se esgotando nos grandes centros urbanos do Brasil e

a sociedade cada vez está menos disposta a ter um aterro em sua vizinhança, por isso, as outras técnicas de disposição final de resíduos sólidos devem ser aplicadas conjuntamente, a fim de se reduzir a quantidade de resíduo sólido depositada nos aterros.

Portanto, uma política nacional e racional de gerenciamento dos resíduos sólidos é extremamente necessária ao País.

Como decorrência desta proposta foram elaborados, no Brasil, diversos Projetos de Lei sobre resíduos sólidos urbanos.

Com relação à reciclagem de embalagens, tem-se a **Portaria nº 987, de 8 de dezembro de 1998**, publicada pela Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde que estabelece o Regulamento Técnico para Embalagens descartáveis de polietileno tereftalato PET, multicamada destinadas ao acondicionamento de bebidas não alcoólicas carbonatadas. Este Regulamento Técnico estabelece as condições gerais e os critérios de avaliação das embalagens de PET multicamada, bem como seu processo de fabricação.

As embalagens de PET multicamadas são obtidas pelo processo de co-injeção e sopro, constituídas por uma camada externa de PET virgem, uma camada intermediária de PET reciclado (com espessura 200µm) e uma camada interna (barreira funcional) de PET virgem (com espessura 25µm). Além destes requisitos específicos, a vida útil do produto embalado não deve ser superior a um ano e elas somente devem ser utilizadas para conter bebidas não alcoólicas carbonatadas em condições de enchimento e conservação à temperatura ambiente ou abaixo da ambiente.

Tanto a habilitação dos estabelecimentos fornecedores de flocos de PET reciclado quanto dos estabelecimentos produtores de embalagens descartáveis de PET multicamada para bebidas não alcoólicas carbonatadas e a aprovação do processo utilizado pelas empresas são de incumbência da Autoridade Sanitária competente.

Com o advento da Lei Federal nº 9.605 de 13 de fevereiro de 1998, grandes inovações são introduzidas na legislação ambiental brasileira, com a responsabilização penal da pessoa jurídica e a forma de penalização às condutas danosas ao meio ambiente. A regra do art. 3º, responsabilizando administrativa, civil e penalmente as empresas, quando cometida a infração "por decisão de seu representante legal ou contratual, ou de seu órgão colegiado, no interesse ou benefício da sua entidade" coloca, como nunca, a necessidade de adoção de procedimentos internos de prevenção e correção de problemas ambientais e de elevação do padrão de qualidade gerencial do meio ambiente.

Pressionado por exigências cada vez mais fortes do mercado internacional, o setor empresarial do país vê-se impelido a adotar estratégias de gestão ambiental, não só, agora, para eliminar desconformidades legais e atender às crescentes investidas dos órgãos ambientais, mas, principalmente, para garantir sua permanência num mercado altamente competitivo.

Portanto, no desenvolvimento de embalagens deverá se levar em conta o impacto no meio ambiente, com destaque para: economia de energia; preservação de recursos naturais; redução/eliminação de poluentes; qualidade da água; redução das emissões (efeito estufa, acidificação); desenvolvimento com base no ciclo de vida do produto; uso para geração de energia; biopolímeros – fonte renovável; redução de perdas do produto acondicionado (produção e transporte); relação quantidade de embalagem por desempenho; redução do peso mantendo o

desempenho; minimização da relação massa de embalagem por quantidade de produto; efeitos ocupacionais – redução de solventes de impressão, decoração e laminação; monômeros residuais; evitar ou padronizar a pigmentação, visando a reciclagem; uso de monomaterial ou facilidade de separação de materiais, tendo em vista a reciclagem; aditivos ou tratamentos que atrapalham a reciclagem; metais pesados em pigmentos, corantes e tintas; aprovação de novos aditivos ou materiais de embalagem, pelo FDA (Food and Drug Administration), leva em consideração o impacto ambiental.

No dia 2 de maio de 2000, o Instituto Adolfo Lutz sediou, em parceria com o CEMPRE (Compromisso Empresarial para Reciclagem), a Conferência "PET RECICLADO PARA CONTATO COM ALIMENTOS: APLICAÇÕES, TECNOLOGIAS, TESTES, SEGURANÇA E PANORAMA ATUAL – PERSPECTIVA GLOBAL", apresentada pelo Dr. Forrest Bayer, Diretor de Embalagens da *The Coca-Cola Company*.

Este é um tema de grande atualidade em razão das discussões sobre o destino apropriado dos resíduos sólidos urbanos que estão sendo realizados tanto no âmbito legislativo como executivo. Além disto existem diversos aspectos de regulamentação, segurança do uso, econômicos e sociais relacionados à atividade de coleta e reciclagem do PET que merecem uma reflexão técnica e política dos legisladores, pesquisadores, educadores, executores de políticas ambientais, industriais e outros formadores de opinião.

#### Referências:

1. Brasil, Leis, Decretos, etc. Portaria 987/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 31 mar.1999. Seção 1, pt. 1, p.30-31. Regulamento Técnico para Embalagens Descartáveis de Polietileno Tereftalato - PET - Multicamada destinadas ao acondicionamento de bebidas não alcoólicas carbonatadas.
2. Celulose e Papel. Um Imperativo: Proteger o equilíbrio da natureza. São Paulo, 6(28): 8-13, mai/jun. 1990.
3. Christopher Wells. Reports on recycling initiatives in Brazil, intended to establish resource recovery as a modern, effective process. **Warner Bulletin**, Tonbridge, Nº 51, p.10-11, nov. 1996.
4. Coltro, L.; Reis, A.P.C. A questão dos resíduos sólidos urbanos no Brasil. **Informativo CETEA**, Campinas: vol. 11, Nº 2, p. 4-7, abr/mai/jun. 1999.
5. Coltro, L.; Reis, A.P.C. Gerenciamento de resíduo sólido urbano no Brasil. **Informativo CETEA**, Campinas: vol. 10, Nº 2, p. 7-9, abr/mai/jun. 1998.
6. Compromisso Empresarial para Reciclagem – CEMPRE – **Jornal Informativo**. Ano VII, Nº 44, mar/abr. 1999.
7. Compromisso Empresarial para Reciclagem – CEMPRE – **Jornal Informativo**. Ano VIII, Nº 49, jan/fev. 2000.
8. Garcia, E.E.C. Desenvolvimento de embalagem e meio ambiente. In: Seminário Embalagem, Distribuição e Consumo. São Paulo, **Anais**, 2000.
9. **Informativo CETEA – A embalagem e o Meio Ambiente**. Campinas: vol. 1, Nº 5, 9 p. set/out. 1989.
10. Kooijman, J.M. Environmental assessment of food packaging: impact and improvement. **Packaging Technology & Science**, Bognor Regis, vol. 7, Nº 3, p.111-121, 1994.
11. The European Parliament. Directive 94/EC of the European Parliament and the council on Packaging and Packaging Waste. December, 1994. 12p.

## NOTÍCIAS

### ANVISA libera etiqueta que adverte para o consumo humano do palmito em conserva\*.

\*Mário Tavares, Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos, Instituto Adolfo Lutz - Central; e-mail: tavaresm@ial.sp.gov.br

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde já autorizou a retirada da etiqueta com a advertência "Para sua segurança, este produto só deverá ser consumido após fervido no líquido de conserva ou em água, durante 15 minutos" da embalagem de algumas marcas de palmito, conforme listas que vêm sendo publicadas e atualizadas no Diário Oficial da União.

A colocação da etiqueta foi determinada pela Portaria SVS/MS Nº 304, de 08 de abril de 1999. A medida foi adotada pela ANVISA para evitar ocorrências de botulismo, doença causada pelo *Clostridium Botulinum*, que pode ser encontrado nas conservas de palmito. Nos últimos dois anos, foram registrados três casos de botulismo só em São Paulo. As pessoas afetadas pela doença teriam consumido palmito em conserva.

Outra precaução da ANVISA foi inspecionar todas as indústrias que fabricam palmitos. As inspeções começaram em agosto de 1999. O prazo dado pela agência para que as empresas se adequassem às resoluções nºs 17 e 18, que regulamentam a produção do palmito, terminou em 19 de fevereiro de 2000. A partir de então, começaram a ser realizadas reinspeções para verificar se as indústrias cumpriram as exigências feitas. Dentre elas, estão alterações na estrutura física das fábricas, como trocar revestimentos inadequados de paredes e pisos por material mais resistente, lavável e impermeável, e substituição de equipamentos de madeira por inox. As indústrias têm também que seguir as boas práticas de fabricação para o palmito e treinar um técnico para acompanhar todo o processo de fabricação do produto.

Além disso, a embalagem de palmito terá que trazer litografada na tampa a identificação da indústria com nome, endereço e CGC, além de informar a origem da palmeira (palmito açai, pupunha ou jussara).

As indústrias que não cumpriram com os itens exigidos terão seus registros cancelados. Assim que outras indústrias forem aprovadas pelas inspeções sanitárias e as distribuidoras recadastradas, seus nomes serão publicados no DOU e elas poderão ter seus produtos comercializados sem a apresentação do selo de advertência.

As inspeções são feitas por um técnico da vigilância sanitária local, onde é produzido o palmito, por um técnico de uma vigilância vizinha e, se for necessário, por um técnico da ANVISA.

As indústrias que iniciarem o processo produtivo do palmito em conserva serão inspecionadas e terão seu registro publicado no DOU somente após cumprirem todos os itens exigidos na legislação. Neste caso, elas iniciarão a comercialização do produto liberadas da etiqueta de advertência. Para encontrar a relação destas indústrias o usuário deverá acessar o [banco de dados](#).

Fonte: Agência Saúde (<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/070400.htm>)

Republicado o Regulamento Técnico para os óleos e gorduras vegetais\*.

Na edição anterior do BIAL, foi divulgada, às páginas 47 e 48, a aprovação do regulamento técnico fixando a identidade e a qualidade de óleos e gorduras vegetais, através da Resolução Nº 482, de 23/09/99 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Como foram constatadas incorreções na versão original, a citada resolução foi republicada no Diário Oficial da União de 20/06/2000, nº 118-E, Seção 1, páginas 21 a 25.

## X Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas da IUPAC Casa Grande Hotel/Guarujá, Brasil – 21 a 25 de Maio/2000

Myrna SABINO

Seção de Química Biológica/I.A.Lutz

### Introdução

Fundada em 1919, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) é uma Associação não lucrativa de 43 Organizações Nacionais representando os químicos de seus países. Adicionalmente há 15 países observadores, 32 Associações ou Sociedades e mais de 140 Companhias associadas.

Os principais objetivos da União são:

- Promover continuamente cooperação entre os químicos dos países membros;
- Estudar tópicos de importância internacional para a química pura e aplicada que necessitam de padronização ou codificação;

- Cooperar com outras organizações internacionais que tratam com tópicos de natureza química;
- Contribuir para o avanço da química pura e aplicada em todos os seus aspectos.

A IUPAC é dirigida por um Conselho, composto por delegados dos países membros que se reúnem bi-anualmente em Assembléia Geral. Há também um Comitê Executivo apoiado por um Diretor Executivo e Secretaria Executiva, que coordena as atividades das 7 Divisões e suas Comissões. Há também 6 Comitês Permanentes com amplas responsabilidades para aconselhar o Comitê Executivo.

A principal publicação da IUPAC é: *Pure and Applied Chemistry*, onde são publicadas as recomendações dos Comitês e Comissões sobre nomenclatura, símbolos, unidades, terminologia e outros assuntos de interesse (técnicos e científicos). Outras publicações incluem *Chemistry International*, proceedings de Simpósios, compilações de dados, referência de livros e compendio de nomenclatura.

IUPAC é membro do "International Council of Scientific Unions" (ICSU) e participa de seus comitês científicos. A IUPAC se relaciona com outras organizações internacionais envolvidas com problemas químicos, como a WHO (Organização Mundial da Saúde), FAO, UNESCO, OIML e ISSO.

A maior iniciativa da IUPAC nos últimos anos tem sido o programa **CHEMRAWN**- Chemical Research Applied to World Needs, onde identifica problemas importantes: global ou multinacional para o qual a química pode contribuir significativamente.

A Comissão de Química dos Alimentos, da IUPAC (IUPAC Food Chemistry Commission), considerando o problema das Micotoxinas, organizou o 1º Simpósio Internacional de Micotoxinas em 1973 na Suécia e a partir do 4º Simpósio, na Suíça, adicionou Ficotoxinas.

Os Simpósios já realizados foram:

- 1º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas – 1973 Kungälv/Suécia
- 2º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas – 1974 Pulawy/Polônia
- 3º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas – 1976 Paris/França
- 4º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas – 1979 Lausane/Suíça
- 5º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas – 1982 Viena/Áustria
- 6º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas – 1985 Pretoria/África do Sul
- 7º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas – 1988 Tokio/Japão
- 8º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas – 1992 Cidade do México/México
- 9º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas – 1996 Roma/Itália
- 10º Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Ficotoxinas-2000 Guarujá/Brasil**

Em 1997, como Membro Titular da Comissão de Química dos Alimentos/IUPAC, na reunião realizada durante a Assembléia Geral da IUPAC em Genebra/Suíça, apresentei a

proposta de organizar o X Simpósio no Brasil e pelo documento por nós apresentado foi aprovada por unanimidade a realização do evento no Brasil.

Comitê Organizador ficou constituído pelos seguintes membros:

#### **Comitê Organizador Nacional:**

- Myrna Sabino – I.A.Lutz/ Brasil – Presidente
- Delia Rodriguez Amaya – FEA,UNICAMP/Brasil
- Benedito Corrêa – ICB,USP/Brasil

#### **Comitê Organizador Internacional:**

- John Gilbert – CSSL,MAFF/UK
- Hans van Egmond-RIVM/The Netherlands
- Douglas L Park- Louisiana State University/USA

#### **Comitê Científico Internacional:**

- Delia Rodriguez Amaya/Brasil
- Sandra M F O Azevedo/Brasil
- E.Boutrif/FAO, Rome
- Wayne Bryden/Austrália
- Pedro Burdaspal/Espanha
- Hans van Egmond/Holanda
- Homero Fonseca/Brasil
- John Gilbert/UK
- Rudolf Krska/Áustria
- Marina Miraglia/Itália
- Samuel William Page/UK
- Douglas L Park/USA
- R M Samson/Holanda
- Peter Scott/Canadá
- Gordon S Shephard/África do Sul
- Lucia Valente Soares/Brasil
- Yoshio Ueno/Japão

O nº de participantes ultrapassou 300 (307), procedentes de 47 países. Além das conferências 259 trabalhos foram apresentados e destes 40 foram selecionados para apresentação oral sendo 30 de micotoxinas e 10 de ficotoxinas. Os demais trabalhos a apresentação foi na forma de pôster.

Os trabalhos orais juntamente com as conferências, estão sendo publicados na íntegra em um livro, que deverá sair ainda este ano, na Holanda por Ponsen & Looijen Publishers.

Foram oferecidos 2 prêmios para os melhores trabalhos:

1. Premio ILSI Brasil – US\$ 1,000 (melhor trabalho oral)
2. Premio BRASEQ – US\$ 500.00 (melhor pôster)

Para participar do Comitê Julgador dos trabalhos, tivemos o cuidado de convidar especialistas que não tivessem nenhum vínculo e/ou participação em algum trabalho. Foi assim composto o Comitê:

- Samuel William Page, PhD – FDA Scientific Director, que também representou a AOAC-Washington/USA
- Jean Marc Fremy, PhD – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)-Paris/França

- Willem de Koe, PhD – Dutch Food Inspection Service/ Holanda, responsável pelo Proceedings do Simpósio que está sendo editado na Holanda.

O prof John Gilbert do CSL/MAFF,UK, além de ser membro do Comitê Organizador Internacional é chairman da Comissão de Química dos Alimentos (IUPAC Food Chemistry Commission), foi o Representante Oficial da IUPAC e na Cerimônia de Abertura fez uma apresentação sobre a IUPAC.

Redigiu também um artigo sobre o Simpósio que deverá sair na revista **Chemistry International/IUPAC**.

Os ganhadores dos prêmios foram:

**Premio ILSI Brasil**

**Trabalho:** Hair: A non-invasive matrix for assessing chronic to fumonisin mycotoxins.

V.Sewram, T.W.Nieuwoudt, J.J.Nair and G.S.Shephard.

Programme on Mycotoxins and experimental Carcinogenesis (PROMECC) -Medical Research Council, P.O.Box 19070, Tygerberg, 7505, South Africa.

**Premio BRASEQ**

**Trabalho:** Determination of Domoic Acid in Aqueous Sample using solid phase microextraction technique coupled to Liquid Chromatographic.

L.P.Keong, N.W.Fang and Gopalakrishnakone.

D.S.O.National Laboratories, 20 Science park Drive, Singapore 118230, Republic of Singapore.

Informamos que o evento foi um sucesso, considerado o melhor de todos já realizados, não somente na organização mas principalmente o alto nível da programação científica e as discussões após as apresentações (palestras e apresentação dos trabalhos).

## AGENDA DE EVENTOS 2001

**XXIV Reunião Anual da SBQ - Sociedade Brasileira de Química**

A Química na América Latina – Integração e Desenvolvimento Sustentável

Poços de Caldas – Minas Gerais / Brasil

28 a 31/05/2001

**Simpósio em Alimentos (Alimentos & Saúde)**

Pela SBCTA-SC/ CAL/ UFSC

Florianópolis – Santa Catarina/Brasil

07 e 08/06/2001.

**World Chemistry Congress**

Brisbane/ Austrália

01 a 06/07/2001

www.ccm.com.au/wcc

**World Congress AOAC**

Kansas City – EUA

09 a 13/09/2001

**Congresso Brasileiro de Microbiologia**

Foz do Iguaçu – Paraná/Brasil

21 a 25/10/2001

**Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Campinas – São Paulo/ Brasil

06 a 09/11/2001

**XII Congresso Brasileiro de Toxicologia**

Porto Alegre – Rio Grande Do Sul/ Brasil

11 a 15/11/2001

**AOAC América Latina e Caribe**

Montevideo – Uruguai

18 a 22/11/2001

**Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**

18 a 22/11/2001

Maceió – Alagoas – Brasil

Hotel Melia

**III Congresso de Ciências Farmacêuticas**

08 a 11/04/2001

Águas de Lindóia – SP – Brasil

**XII Congresso Paulista de Farmacêuticos**

**4º Seminário Internacional de Farmacêuticos**

EXPOFAR/2001

01 a 04/ 11/2001

São Paulo – SP – Brasil

**IV Congresso Nacional de Psicologia**

21 a 24/06/2001

UNB – Campus Universitário Darcy Ribeiro – Ed. Finatec

Brasília – DF – Brasil

**IX Congresso Paulista de Pneumologia e Tisiologia**

15 a 18 de Novembro de 2001

Centro de Convenções Rebouças São Paulo

**IV Simpósio Brasileiro de Pesquisa em Aids**

25 a 28 de Agosto de 2001.

Costa do Sauípe - BA

## Finalidade:

Divulgação de informações técnicas e assuntos de interesse em Saúde Pública originária de atividades desenvolvidas pelo Instituto Adolfo Lutz.

## Regulamento

O BIAL publica as **matérias de interesse em Saúde Pública** enquadradas num dos itens abaixo:

- 1- Relatos sucintos de investigação com ênfase em aspectos relativos ao apoio laboratorial oferecido.
- 2- Informações sobre dados levantados a partir de registros existentes nos laboratórios do Instituto, sem análise pormenorizada destes dados.
- 3- Editoriais, notas e informações relativos a temas de atualidades.
- 4- Resenhas de livros.
- 5- Relatório de pesquisa.
- 6- Nótulas de literatura.

## Instrução para Publicação

- 1- A matéria para publicação deverá apresentar a seguinte estrutura:
  - ✓ Título-
  - ✓ Nome do(s) autor(es) completo por extenso
  - ✓ Filiação científica
  - ✓ Texto
  - ✓ Referência (quando necessária)
- 2- O texto deverá ser digitado em fonte Times New Roman, tamanho 12 e com espaço duplo, ocupando no máximo 2(duas) laudas de tamanho A4;
- 3- Deverá ser redigido em língua portuguesa;
- 4- Uso de tabelas e gráficos somente quando necessários, devendo ser auto-explicativos e numerados;
- 5- A referência bibliográfica, quando necessária, deverá ser citada no texto por meio de número índice sobrescrito, correspondente ao da lista de referência.
  - ✓ Para um autor: "Taunay<sup>31</sup> verificou..."
  - ✓ Até dois autores deverá ser mencionado: "Pereira e Maia<sup>19</sup>, pesquisando..."
  - ✓ Mais de dois autores usar a expressão **et al.**: "Tsunoda et al.<sup>6</sup> verificaram..."
- 6- A relação da referência deverá ser numerada e colocada em ordem alfabética dos sobrenomes dos autores. Para até três autores, todos deverão ser mencionados. Para mais de três autores usar a expressão **et al.** após o primeiro autor.
  - ✓ Artigo: Sobrenome do autor (ou dos autores) seguido das iniciais; Título do trabalho; Título do periódico (negrito); Volume; Nº do volume; Nº página inicial; Nº da página final; Ano.

Ex.: Morley, A. et al. A primary stem-cell lesion in experimental chronic hypoplastic marrow failure. **Blood**, 45:681-8, 1975.

Yamada, K. & Tsuji, M. Transport of vitamin B6 in human erythrocytes. **J.Vitam.**, 14:282-94, 1978.

- ✓ Livro no Todo: Sobrenome do autor (ou dos autores) seguido das iniciais; Título do livro(negrito); Edição; Local de publicação; Editora; Ano; Nº de páginas ou volumes. Ex.: Naoum, P.C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. 1ª Ed., São Paulo: Sarvier; 1997, 171p.
  - ✓ Capítulo de Livro: Sobrenome do autor ( ou dos autores) do capítulo, seguido das iniciais; Título do capítulo; sobrenome do autor (ou autores) do Livro (precedido por In) seguido das iniciais; Título do livro (negrito); Edição; Local de publicação; Editora; Ano; Página inicial e final do capítulo e/ou volume. Ex.: Mansfield, J.M. Non pathogenic trypanosomes of mammals. In: Kreir, J.P. **Parasitic protozoa taxonomy, kinetoplastids and flagellates of fish**. New York: Academic Press; 1977, p.297-327.
- 7- A matéria deverá ser enviada em uma cópia impressa e em disquete 3 1/2.
  - 8- A publicação de qualquer matéria estará condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz.
  - 9- Enviar o material ao Coordenadores das respectivas áreas:
    - ✓ Área de Vigilância Epidemiológica  
Marilena Oshiro - maoshiro@ial.sp.gov.br  
Ramal 2878  
Silvana Tadeu Casagrande - scasagra@ial.sp.gov.br - Ramal 2893
    - ✓ Área de Vigilância Sanitária  
Márcia Regina P. do Amaral Mello - mrmello@ial.sp.gov.br  
Ramal 2936  
Maria Ângela Pompeu Zorzetto - mzorzetto@hotmail.com  
Ramal 2930
    - ✓ Área de ações Básicas de Saúde  
Daisy Nakamura Sato - satodn@netsite.com.br  
Tel.(xx16) 625-5046

**Fica autorizada a reprodução das matérias publicadas neste Boletim, desde que citada a fonte.**

## Carta ao Editor

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - CEP 01246-902

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

Caixa Postal 1783 - CEP 01059-970

São Paulo, SP - Brasil

Tel.:(0XX11)3068-2800 - Telex 1136327 - Fax: (00xx11)3085-3505

**Produção Gráfica, Impressão e Acabamento:**

**WINNER**  
*Graph*

**(011) 5584-5753**  
**wg.editora@uol.com.br**

---



ISSN 0073-9855



9 770073 985009