

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 60 número 2, 2001



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

DIRETOR RESPONSÁVEL

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

COMISSÃO DE REDAÇÃO

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

SETOR DE PUBLICAÇÕES

ROCELY APARECIDA DE SOUZA BUENO

ENDEREÇO/ ADDRESS

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246-902 – São Paulo – SP – Brasil
Caixa Postal 1783 – CEP 01059-970
Tel/Fax: 3082-9939

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

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 - 2001,
2001, 60 (2)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈614.07205

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

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

Acesso on line/ on line access
Texto integral/ full text
www.ial.sp.gov.br

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Serão aceitos manuscritos em forma de artigos científicos, de revisões, de atualizações, relatórios técnicos, relatos de casos, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores devem escrever na carta de encaminhamento qual a natureza do trabalho. Os originais serão publicados em língua portuguesa ou inglesa preferencialmente. Deverão ser encaminhados em três vias, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e em disquete 3 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: “Taunay³¹ verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra e: “Pereira e Maia¹⁹, pesquisando...”. para mais de dois autores usar a expressão et al. : “no trabalho de Tsunoda et al.⁶⁹”; ou ainda...“ Segundo vários autores^{1,3,7,8}”.

Observação: nomes científicos somente em itálico.

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

Para artigos periódicos

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

Exemplo:

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

Livro no todo

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

Exemplo:

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

Capítulo de Livro

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

Exemplo:

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

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

Dissertações e Teses

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

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

Exemplo:

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

DA PUBLICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

DA DISTRIBUIÇÃO

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

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo/Article

- 898 - **Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro - Brasil.**
Intestinal parasitism: prevalence in day-care centers of Niteroi city, Rio de Janeiro - Brazil.
Cláudia M. A. UCHÔA, Alexandre G. B. LOBO, Otilio M. P. BASTOS, Alexandre D. MATOS...97
- 899 - **Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva**
Evaluation of sulphur dioxide and microbiological quality of conserved mushrooms
Neura BRAGAGNOLO, Cláudia A. SILVA, Marta H. TANIWAKI103
- 900 - **Avaliação do teor de lipídios em queijos minas frescal industrializados e artesanais e em ricotas comercializados na região de Botucatu-SP**
Lipid level evaluation in industrialized and handmade Minas Frescal cheese and ricottas from the region of Botucatu/SP.
Cristina Durante CRUZ, Maria Isabel Franchi Vasconcelos GOMES109
- 901 - **Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás**
Chemical composition of seeds and oil of baru (*Dipteryx alata* Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás, Brazil.
Emy TAKEMOTO, Isaura Akemi OKADA, Maria Lima GARBELOTTI, Mário TAVARES, Sabria AUED-PIMENTEL 113
- 902 - **Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas no município de São Vicente**
Resistant of *Mycobacterium tuberculosis* to drugs in São Vicente municipality
Priscila C. R. JARDIM, Liliana A.ZAMARIOLI, Andréa G. V. COELHO, Teresa R. FIGUEIREDO, Mauro A. ROZMAN 119
- 903 - **Ovo desidratado para substituir ovo "in natura" na preparação do meio Löwenstein-Jensen para cultivo de micobactérias**
Dehydrated egg to replace "in natura" egg in the preparation of Löwenstein-Jensen medium for mycobacteria culture
Heloísa da S. P. PEDRO, Maria Izabel F. PEREIRA, Maria do Rosário A. GOLONI, Elídia Q. GUIMARÃES, Maria Alice da S. TELLES..... 125
- 904 - **Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa**
Evaluation of analytical methods for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography
Adriana de Queiroz OLIVEIRA, Lucia M. VALENTE SOARES 129
- 905 - **Avaliação de resíduos de Endosulfan em matriz de vagem e soja para comparação de dois sistemas de aplicação do produto formulado**
Evaluation of Endosulfan residue in pod and soybean matrices for comparison of two application systems of formulated product.

Célia Maria Dias CORRÊA, Jorge José do Vale OLIVEIRA, Valdemar Luiz TORNISIELO ..135

906 - **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto – SP**

Physicochemical and microbiological quality evaluation of the pasteurized milk processed by mini and microprocessing plants of the area of Ribeirão Preto, State of São Paulo – Brazil.

Neusa S. GARRIDO, José Mário T. MORAIS, Rita de C. BRIGANTI, Maria Aparecida de OLIVEIRA, Alzira M. M. BERGAMINI, Solange A. V. de OLIVEIRA, Rosa M.D. FÁVARO..141

907- **Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida**

Aflatoxin M₁ in soft and parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography

Guilherme PRADO, Marize S. de OLIVEIRA, Eliana P. de CARVALHO, Thaís VELOSO, Leandro A. F. de SOUSA, Ana Cristina F. CARDOSO.....147

908 - **Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto – SP.**

Occurrence of aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of São José do Rio Preto-SP

Cecília C. M. dos SANTOS, Maria do Rosário Vigeta LOPES, Sandra Y. KOSSEKI 153

909 - **Determinação do teor do princípio ativo e avaliação da inocuidade dérmica e ocular de produtos para o tratamento de ectoparasitoses contendo lindano.**

Quantitative determination of active principle and evaluation of the dermal and ocular safety to treatment of ectoparasitosis products containing lindane.

Lígia L. MIYAMARU, Maria Cristina SANTA BÁRBARA, Maria Helena IHA, Deusdete A. TEIXEIRA, Odair ZENEBO.....159

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Caracterização físico-química e nutricional da polpa de cubiu (*Solanum sessiliflorum* dunal) para aproveitamento industrial.

..... 163

Significado de prognóstico do rearranjo de gene para receptor da célula T gama em Mieloma Múltiplo

..... 163

Isolamento e Identificação dos Vírus da Influenza A em Aves Silvestres Residentes e Migratória no Estado de São Paulo.

.....164

Infecção Crônica pelo Vírus da Hepatite B – Estudo Imuno-histoquímico com Ênfase na Detecção dos Antígenos HBe e HBx.

..... 164

Agradecimentos aos relatores

NECROLÓGIO

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY – (1912-2000)



Augusto de Escragnolle Taunay, filho do Dr. Afonso Escragnolle Taunay e de dona Sara de Souza Queiroz Taunay, nascido aos 19 de julho de 1912 em São Paulo, capital, teve sua formação escolar primária e secundária no Ginásio São Bento para a seguir cursar a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo onde se formou em 1936.

Aos 1º de julho de 1937 foi contratado assistente do Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela então dirigido pelo Dr. Henrique de Beaurepaire Aragão destacado cientista do Instituto Oswaldo Cruz; Taunay exercia sua função no Instituto Bacteriológico onde realizava necropsias em casos suspeitos de Febre Amarela assim como as fazia em cidades outras, muitas vezes em precárias condições, tendo como auxiliar Antonio Amorosino, técnico do Bacteriológico.

Em 23 de agosto de 1938 foi nomeado Assistente do Instituto Bacteriológico que, em 1940 ao se juntar ao Laboratório Bromatológico de São Paulo passou a denominar-se Instituto Adolfo Lutz; em 27 de outubro de 1940 nomeado Biologista do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo, tendo sido designado para exercer a função de chefia da Seção de Bacteriologia.

Aos 22 de junho de 1940, Taunay casou-se com Angélica de Ulhôa Cintra Taunay, filha de Dr. João Florence de Ulhôa Cintra e de dona Adelina Castro de Ulhôa Cintra.

Em 25 de novembro de 1946 ocorreu a transformação do cargo de Biologista para a de Médico e em 07 de fevereiro de 1951 foi designado chefe de Seção de Bacteriologia da Divisão de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz sendo em 1966 nomeado Diretor efetivo da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico, atualmente Divisão de Biologia Médica, em substituição ao Dr. Luiz S. de Salles Gomes que se aposentara.

Finalmente aos 07 de março de 1967 foi designado Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz, cargo em que permaneceu até completar 70 anos, quando se aposentou compulsoriamente, aos 16 de julho de 1982.

Em 1945 Taunay foi designado pelo então diretor do Departamento de Saúde do Estado de São Paulo, Prof Dr. José Pedro de Carvalho Lima, para uma bolsa de estudos nos Estados Unidos da América do Norte, onde permaneceu um ano estagiando nos Laboratórios de Saúde Pública do Estado de Michigan e na Divisão de Pesquisas do Laboratório de Saúde Pública do Estado de Connecticut.

Em 1951 designado pelo Senhor Secretário da Saúde Pública e da Assistência Social do Estado de São Paulo, foi a Montevideú observar o “Centro Sul Americano de Enterobactérias” do Instituto de Higiene de Montevideú, onde pontificavam os Drs. E. Hormaeche e C. A. Peluffo com suas pesquisas sobre salmoneloses.

Transcrevemos a seguir trechos de seu “Curriculum Vitae” de autoria do próprio Taunay: “Assumindo a Seção de Bacteriologia, alteramos sua metodologia no sentido de melhorar o diagnóstico e tornar o laboratório um instrumento básico necessário à pesquisa bacteriológica e epidemiológica. Foram pesquisados e introduzidos novos meios de cultivo, seletivos, diferenciais e presuntivos e iniciada a produção de anti-soros diagnósticos. Assim conseguimos comprovar em nosso meio, a importância das salmonelas como agentes desintergenos e estudar a estrutura antigênica da *Shigella alkalescens*”.

Em 1945, após estágio de um ano no Connecticut State Laboratory vimos confirmadas as alterações técnicas introduzidas e com os padrões que necessitávamos, pudemos já em 1947, contar com um “Centro de Pesquisas para Enterobactérias” de interesse sanitário, o primeiro a ser instalado no Brasil.

Conseguimos assim positivar a freqüência e a predominância dos tipos de Enterobactérias patogênicas; comprovar melhores métodos de exame e de coleta de material; demonstrar e identificar pela primeira vez no Brasil a *E. coli* G.E.I. como um dos agentes da gastroenterite infantil; reproduzir com esse germe no cobaio, lesões intestinais semelhantes às da diarreia fulminante do recém-nascido; comprovar que em hospitais carentes de higiene, tais bactérias podem provocar epidemias severas, nas quais, a via aérea deve constituir importante meio de transmissão.

Atendemos também uma pesada rotina de trabalho sempre visando de preferência ao esclarecimento da etiologia das principais doenças transmissíveis.

Em 1972, na vigência de grave epidemia de doença meningocócica, logo de inicio, caracterizamos o meningococo prevalente e estabelecemos seu comportamento frente aos quimioterápicos. Dada a extensão do problema e a singularidade de se sucederem duas ondas epidêmicas ocasionadas por tipos diferentes de meningococos e a necessidade de avaliar a resposta imunitária à vacinação específica, a tecnologia teve que ser altamente diversificada. A complementação dessas investigações é objeto agora de um programa de pesquisa que está sendo desenvolvido em colaboração com o National Institute of Health U.S.A., visando esclarecer aspectos de laboratório da doença meningocócica e das meningites purulentas em geral.

Criados os recursos técnicos, passou o laboratório a ser solicitado por grande número de pesquisadores, seja para atualizar conhecimentos, complementar trabalhos ou para realização de teses, prestação de serviço esta que continua como rotina normal até hoje. A necessidade de produzir soros diagnósticos, antígenos específicos e reagentes especiais para nosso uso, passou a ser uma norma da Instituição que hoje, através do seu Fundo Especial de Despesa, os distribui por todo país, assim como para entidades particulares.

Ao assumir a direção geral do Instituto a primeira preocupação foi a de obter melhorias das condições de trabalho: aumentando o espaço físico destinado aos laboratórios, adquirindo equipamento adequado, contratando serviço de manutenção especializada e regularizando o fornecimento do material de consumo. Com a reforma administrativa de 1970, foi estudada uma estrutura mais funcional que apesar de implantada, não teve ainda as conseqüências esperadas pela falta de criação dos cargos de chefia e direção.

Sempre que possível, procuramos incentivar a ida de nossos auxiliares ao exterior e ao mesmo tempo entramos em contato com alguns dos Institutos da USP com quem acordamos em realizar no Instituto Adolfo Lutz parte dos cursos de pós-graduação de responsabilidade da USP, ocasião em que não só o nosso corpo de técnicos é utilizado como também o é precioso material didático de nossa rotina de trabalho.

Por solicitação direta do Senhor Ministro da Saúde estamos realizando cursos de especialização em laboratório de Saúde Pública, destinados a técnicos superiores provenientes de várias unidades da federação. Até o momento já foram aprovados 42 técnicos, que aqui realizaram intenso treinamento, com constante orientação e acompanhamento em regime integral.

Julgamos necessários maiores detalhes sobre a intensidade da epidemia meningocócica que assolou São Paulo para melhor se avaliar o desempenho do Instituto, em especial das Seções de Bacteriologia e Imunologia, frente a essa eventualidade.

Nos anos de 1966 a 1970, o número médio dos casos de meningite meningocócica internados no Hospital Emílio Ribas era de 136 pacientes por ano; no ano de 1971 subiu para 627, em 1972 para 1579 caracterizando surto epidêmico cujo agente enológico predominante foi *Neisseria meningitidis* sorogrupo C. Nos anos seguintes 1973 e 1974 manteve-se ao redor de 1900 casos comprovados, porém em maio de 1974 ocorreu nova onda epidêmica agora associada ao meningococo do sorogrupo A, com tal intensidade que em dezembro desse mesmo ano, decorridos apenas oito meses, já haviam sido comprovados 6533 casos, caracterizando uma das maiores epidemias de doença meningocócica de que se tem notícia.

Coube ao Instituto Adolfo Lutz a imensa tarefa de efetuar toda a rotina diagnóstica dos pacientes internados em diferentes hospitais, preferencialmente, até à saturação, no Hospital Emílio Ribas. Houve mesmo um dia em que mais de setecentos pacientes procuraram esses hospitais, com suspeita de meningite! Como seria possível colher e transportar líquido cefalorraquidiano ao Instituto, em condições ideais? Como solução, pesquisadores do Instituto implantaram e padronizaram a reação de imunoeletroforese cruzada que permite identificar no líquor ou em outros líquidos orgânicos tais como urina e soro, antígenos específicos dos vários sorogrupos de meningocócicos.”

Em face da brilhante atuação desempenhada pelo Instituto Adolfo Lutz, o Governo Federal outorgou duas comendas: Ordem de Rio Branco, grau de oficial ao Dr. Augusto de Escragnolle Taunay e a Medalha Oswaldo Cruz ao próprio Instituto Adolfo Lutz pelos serviços prestados a nação brasileira, em especial por ocasião das epidemias de meningite. Foi ainda agraciado com a comenda “Amigo da Marinha”.

A partir de 1982, o Governo Federal através do Ministério da Saúde, reconheceu o mérito do Instituto, indicando-o como “Centro de Referência Nacional para Meningites” cabendo-lhe, além do apoio diagnóstico na vigilância das meningites bacterianas, o treinamento do pessoal técnico, a produção de reagentes, o repasse de tecnologia de diagnóstico, enfim assessoria total. Como Coordenador foi designado o Dr. Carmo Elias Andrade Melles, desde então até os dias atuais.

Em 1960 Taunay foi convidado para professor titular da disciplina de Bacteriologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos pertencente à Universidade “Júlio Mesquita Filho” do Estado de São Paulo da qual ao se aposentar em Outubro de 1983, recebeu o título de Professor Emérito, conferido pela Douta Congregação.

Como fecho de ouro dos estudos sobre salmoneloses, um de seus assuntos prediletos, Taunay e colaboradores publicaram em 1996 alentado relatório intitulado: “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. No período de 1950-90 foram identificadas 45.862 cepas de *Salmonella*, sendo 31.517 provenientes de infecções humanas e 14.345 de materiais de origem não humana, e analisadas as alterações ocorridas quanto à frequência dos sorotipos isolados neste período. Assim é que no período 1950-66 não houve predomínio evidente de nenhum sorotipo; entretanto no período 1968-76, a *S. typhimurium* passou a ser o sorotipo predominante, representando 77,7% dos sorotipos isolados. Observou-se também, aumento significativo da *S. agona* assim como o aparecimento de grande variedade de sorotipos. Quanto às salmonelas de origem não humana, chama atenção o grande número de sorotipos isolados, mais de 100. Quanto aos sorotipos isolados de materiais de origem humana, 74,9% foram isolados de fezes, 15,5% de sangue e 3,7% do líquido cefalorraquidiano. Os autores assinalam a coincidência da ocorrência de surto de meningite por *S. typhimurium* com a epidemia de meningite meningocócica (1972 a 1975); registram ainda a ocorrência de surto de meningite por *S. grumpensis*, sorotipo não detectado na região até aquela época, o que enfatiza as observações dos autores de que qualquer sorotipo poderá provocar epidemias graves e prolongadas. Concluem que este trabalho mostra o importante papel do Laboratório de Saúde Pública no estudo de uma das principais zoonoses do mundo.

Taunay compareceu a mais de 20 Congressos científicos com apresentação de trabalhos assim como participando de mesas redondas ou pronunciando conferências.

Publicou cerca de 70 trabalhos científicos em revistas nacionais e estrangeiras, sendo que em seis deles recebeu prêmios de associações científicas, o de maior destaque sendo o Prêmio “Alvarenga” da Academia Nacional de Medicina, em 1962, com o trabalho “Pielonefrites”.

Por decreto nº 4424 de 1974 passou a exercer o cargo de Diretor Técnico, Divisão Nível I, em regime de tempo integral.

Em 1976, a convite do Ministério da Saúde participou como perito representante do Brasil da reunião sobre “Meningite Meningocócica” em São Paulo e Brasília de 23 a 28 de fevereiro de 1976 sendo expositor do tema “Experiência brasileira no diagnóstico de laboratório da meningite Meningocócica”.

Em 06 de setembro de 1976 pela Portaria nº 335-Bsb foi nomeado pelo Ministro da Saúde para integrar o Conselho Técnico Científico da Fundação Oswaldo Cruz.

De 15 a 23 de outubro de 1977 foi convocado pelo Ministério da Saúde para representar o Brasil na reunião dos Diretores Nacionais de Laboratórios de Controle de Produtos Biológicos na cidade do México.

De acordo com a análise do Prof Eliseu A. Waldman, em 1967 quando Taunay assumiu a Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz, coincidiu com o início da primeira gestão do Prof Dr. Walter S. Leser na Secretaria da Saúde do Estado; seguramente a década de 1970 constituiu o período áureo do modelo de Laboratório de Saúde Pública implantado por Carvalho Lima, que se adequava perfeitamente tanto a reforma administrativa e à implantação dos programas de saúde promovidos por Leser, como à política de extensão da cobertura de serviços de saúde prevista pelo 2º Plano Nacional de Desenvolvimento. Essa feliz coincidência permitiu a construção de novos prédios para os laboratórios regionais, com instalações adequadas e modernas, consolidando uma rede que atingiu em 1980, doze laboratórios regionais que Taunay visitava anualmente, quando possível, além de dez distritais.

O Ministério da Saúde fez do Instituto Adolfo Lutz o paradigma para a implantação do Sistema Nacional de Laboratório de Saúde Pública, designando-o Laboratório Nacional de Referência, responsável, portanto pela padronização das técnicas e pela formação de recursos humanos necessários ao referido sistema. Aconteceu então o fortalecimento dos laboratórios regionais no interior da instituição à medida que estabeleceu, de forma clara, o seu papel no contexto da política sanitária então vigente.

A capacidade de trabalho de Taunay sempre foi impressionante e sem limites, alimentada por privilegiada inteligência e incrível memória, características alias semelhantes às de seu pai, o Dr. Afonso de Escragnolle Taunay ao qual tive o privilégio de conhecer pessoalmente. Ademais era assíduo leitor de publicações científicas e tudo isto somado à pesada rotina produziam numerosos assuntos a pesquisar visando de preferência ao esclarecimento de determinados aspectos de doenças transmissíveis. Como exemplos, as shigeloses, as salmoneloses em suas manifestações e localizações atípicas, a prolongada epidemia de meningites bacterianas que perduraram muitos anos, de 1971 a 1976, a encefalite do Vale do Ribeira, e mais recentemente a Febre Purpúrica Brasileira, nova entidade patogênica ainda em profundos estudos por verdadeira seleção de pesquisadores de múltiplas qualificações. Enfim uma infinidade de problemas de Saúde Pública a solucionar, a esclarecer, quase sempre com êxito final. A harmoniosa figura humana de Taunay revestida de fina educação, extrema simpatia e fácil comunicação granjeava amizade, respeito e retribuição.

Em verdade criou uma nova escola, da Bacteriologia aplicada à Saúde Pública na qual se especializaram seus assistentes, colaboradores e pesquisadores de numerosas outras instituições. Seu vasto currículo é realmente admirável, imenso e variegado.

Aspecto marcante de sua personalidade foi seu acendrado amor ao Instituto Adolfo Lutz do qual se constituiu sustentáculo fundamental cujos efeitos benéficos perdurarão ainda por muito tempo.

Com sua vida ilibada manteve a tradição de seus antepassados, o pai, Dr. Afonso de Escragnolle Taunay; extraordinário historiador de São Paulo e do Brasil, Diretor e reformador do Museu Paulista, e seu avô paterno, Alfredo Maria de Escragnolle Taunay, o inesquecível Visconde de Taunay.

Augusto de Escragnolle Taunay faleceu dia 25 de março do ano 2000.

Marcelo Oswaldo Álvares Corrêa

Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro – Brasil

Intestinal parasitism: prevalence in day-care centers of Niteroi city, Rio de Janeiro – Brazil

Cláudia M.A. UCHÔA^{1*}
Alexandre G.B. LOBO²
Otílio M.P. BASTOS¹
Alexandre D. MATOS²

RIALA6/898

Uchôa, C.M.A. *et al.* Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):97-101, 2001.

RESUMO. Foi realizado estudo coproparasitológico em 218 crianças que freqüentam creches comunitárias de Niterói/RJ e de 43 funcionários, tendo sido observada uma positividade para enteroparasitas em 120 (55%) e 15 (34,9%) respectivamente. Dentre as amostras positivas das crianças, o parasita que apresentou maior freqüência entre os protozoários foi *Giardia lamblia* (38,3%) seguida por *Entamoeba coli* (26,6%), *Endolimax nana* (17,5%), *Entamoeba histolytica* (11,6%) e *Blastocystis hominis* (2,5%). *E. coli* foi o parasita mais freqüente entre os funcionários. Entre os helmintos, nas crianças, o mais freqüente foi *Ascaris lumbricoides* (30%) seguido por *Trichuris trichiura* (26,6%), *Hymenolepis nana* (0,8%) e *Enterobius vermicularis* (0,8%). O monoparasitismo foi observado em 57,5% das crianças positivas. A alta incidência de enteroparasitas e em especial das protozooses sugere a possibilidade de transmissão interpessoal entre as crianças, contaminação ambiental ou mesmo a ocorrência de ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Tais resultados demonstram a necessidade da implementação de medidas relacionadas a saneamento básico e programas contínuos visando educação sanitária nas comunidades estudadas, o que possibilitará uma melhoria na condição de vida das crianças e, conseqüentemente, melhora do aprendizado e desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE. Enteroparasitoses, criança, creche, Niterói, Rio de Janeiro.

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais ainda constituem um sério problema de Saúde Pública no Brasil, apresentando maior prevalência em populações de nível sócio-econômico mais baixo

e condições precárias de saneamento básico, resultando em altos índices de morbidade^{7,18,19}. Em crianças, principalmente com idades entre 0 a 5 anos, por apresentarem, normalmente, hábitos higiênicos mais precários ou a ausência de imunidade a re-infecções, o parasitismo intestinal torna-se mais freqüen-

¹ Docente Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia

² Discente Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia

* Endereço para correspondência: Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia, Rua Professor Hernani de Mello, 101, 3º andar, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro, CEP 24210-130 – Tel: (21) 2620-0623 – e-mail: uchoa@radnet.com.br

te e relevante, inclusive pela possibilidade de redução da absorção intestinal, podendo influenciar no crescimento e desenvolvimento^{3,9,18}.

Na literatura inúmeros relatos de parasitismo intestinal em crianças que freqüentam creches^{12,15,18}, destacam a importância de se estudar este tipo de instituição, bem como o desenvolvimento de atividades que reduzam a incidência destes agentes. Este trabalho objetivou avaliar a prevalência de enteroparasitoses em crianças que freqüentam creches comunitárias em Niterói/RJ, seus respectivos funcionários e a possível existência de transmissão pessoa a pessoa neste tipo de instituição.

MATERIAL E MÉTODOS

As creches avaliadas neste estudo participam do Projeto “Criança na Creche” da Fundação Municipal de Educação de Niterói/RJ. As creches atendem a crianças residentes em comunidades carentes com idades entre um e seis anos, em áreas de baixo nível sócio econômico. Os funcionários das creches são em sua maioria membros da comunidade local. Todas as creches analisadas funcionam apenas nos dias úteis durante o período diurno apresentando, portanto um regime de semi-internato.

Foram estudadas cinco instituições sendo estas: a Creche Nossa Senhora de Aparecida, localizada no bairro do Ingá atendendo a 70 crianças (Creche 1) e com 11 funcionários; a Creche Criança Esperança localizada no Bairro do Vital Brazil atendendo a 36 crianças (Creche 2) e com 5 funcionários; a Creche Ercílio Marques localizada no Sapê, atendendo a 44 crianças (Creche 3) e com 5 funcionários; a Creche Girassóis no Caramujo, atendendo a 130 crianças (Creche 4) e com 22 funcionários e a Creche Cristo Vive localizada no Beltrão, atendendo a 60 crianças (Creche 5) e com 11 funcionários. A Creche Girassóis constituiu uma exceção, pois por atender a clientela composta por filhos de catadores de lixo, mantém cri-

anças de meses de idade até 11 anos. A participação das crianças foi voluntária com consentimento dos respectivos pais.

De cada criança e funcionário, que aderiram espontaneamente ao estudo (218 crianças e 43 funcionários), foram coletadas três amostras de fezes em diferentes dias⁴. Duas amostras foram coletadas em solução conservante de Railliet-Henry, sendo processadas pelas técnicas de Faust e cols.⁵ e de Lutz¹¹ e uma amostra sem conservante processada pela técnica de Baermann & Moraes¹⁴ para pesquisa de larvas em microscópio estereoscópico. Realizou-se a leitura de uma lâmina para cada método em microscópio óptico. Utilizou-se solução parasitológica de Lugol (1% de Iodo Metálico + 2% de Iodeto de potássio)¹⁶ para diferenciação morfológica dos parasitas e cistos de protozoários.

RESULTADOS

As cinco creches comunitárias estudadas atendem a 340 crianças, sendo que 218 participaram do estudo, representando uma adesão de 64,1%. Destas 218, 120 (55%) estavam positivas pelas técnicas de Faust e cols.⁵ e de Lutz¹¹ ou apenas por uma delas e 98 (44,9%) negativas por ambas. A creche Comunitária dos Girassóis apresentou as maiores taxas de parasitismo e a menor adesão (Tabela 1).

Com relação aos 54 funcionários, a adesão foi de 79,6%. Apenas na Creche Comunitária dos Girassóis a adesão foi mais baixa quando comparada às demais, sendo a positividade entre estes de 34,9% (Tabela 1).

O parasita mais freqüente nas 120 crianças positivas, entre os protozoários foi *Giardia lamblia* (38,3%) em seguida *Entamoeba coli* (26,6%), *Endolimax nana* (17,5%), *Entamoeba histolytica* (11,6%) e *Blastocystis hominis* (2,5%). *E. coli* foi o parasita mais freqüente entre os funcionários (Tabela 2). Entre os helmintos o mais freqüente foi *Ascaris lumbricoides* (30%) seguido por *Trichuris trichiura* (26,6%), *Hymenolepis nana* (0,8%) e *Enterobius vermicularis* (0,8%). Na maioria dos ca-

Tabela 1. Resultado dos exames coprológicos realizado nas crianças e funcionários de cinco creches comunitárias da cidade de Niterói/RJ, no período de maio de 1999 a maio de 2000.

Creche	Crianças				Funcionários				Bairro
	Nº	Positivo	Negativo	Total	Nº	Positivo	Negativo	Total	
Nossa Sra. de Aparecida	70	24 51,1%	23 48,9%	47 67,1%	11	3 27,3%	8 72,7%	11 100,0%	Ingá
Criança Esperança	36	18 51,4%	17 48,6%	35 97,2%	5	0 0,0%	5 100,0%	5 100,0%	Vital Brazil
Ercílio Marques	44	17 53,1%	15 46,9%	32 72,7%	5	0 0,0%	5 100,0%	5 100,0%	Sapê
Girassóis	130	42 71,2%	17 28,8%	59 45,3%	22	6 54,5%	5 45,5%	11 50,0%	Caramujo
Cristo Vive	60	19 42,2%	26 57,8%	45 75,0%	11	6 54,5%	5 45,5%	11 100,0%	Beltrão
Total	340	120 55,0%	98 45,0%	218 64,1%	54	15 34,9%	28 65,1%	43 79,6%	

Tabela 2. Distribuição dos parasitas por espécie observados em função da idade, ao exame de fezes de 120 crianças e dos funcionários que apresentaram positividade das creches comunitárias de Niterói/RJ.

	Crianças (idade em anos)										Total		Funcionários	
	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	nº	%	nº	%
<i>A. lumbricoides</i>	5	4	6	4	7	3	2	1	3	1	36	30,0	2	4,6
<i>T. trichiura</i>	2	5	6	5	7	2	2	1	2	0	32	26,7	2	4,6
<i>H. nana</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,8	0	0,0
<i>E. vermicularis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,8	0	0,0
<i>G. lamblia</i>	3	16	12	5	6	2	1	1	0	0	46	38,3	2	4,6
<i>E. histolytica</i>	0	2	4	2	2	3	1	0	0	0	14	11,7	2	4,6
<i>E. coli</i>	0	2	5	9	5	5	1	3	0	2	32	26,7	9	20,9
<i>E. nana</i>	3	5	5	2	4	0	0	0	1	1	21	17,5	0	0,0
<i>B. hominis</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	3	2,5	0	0,0

Tabela 3. Prevalência de enteroparasitismo observado em 120 crianças que apresentaram resultados positivos de cinco creches comunitárias da Cidade de Niterói/RJ.

Creche	Monoparasitismo	Biparasitismo	Poliparasitismo*
Nossa Sra de Aparecida	16 66,7%	6 25,0%	2 8,3%
Criança Esperança	9 50,0%	6 33,3%	3 16,7%
Ercílo Marques	13 76,5%	3 17,6%	1 5,9%
Girassóis	20 47,6%	14 33,3%	8 19,1%
Cristo Vive	11 57,9%	6 31,6%	2 10,5%
Total	69 57,5%	35 29,2%	16 13,3%

* poliparasitismo – associação entre três ou mais parasitas

tos (57,5%) encontrou-se apenas monoparasitismo, embora tenham sido detectados até quatro parasitas associados em três crianças (Tabela 3). A associação mais observada foi entre *A. lumbricoides* e *T. trichiura* em 17 (14,2%) exames.

Nas 214 crianças que apresentaram idades determinadas, não se observou diferença de positividade entre as diversas faixas etárias, embora o número de crianças de 7 a 11 anos

tenha sido oriundas de apenas 1 creche e em número reduzido (Tabela 4).

A técnica de Baermann & Moraes¹⁴ foi realizada em 192 amostras, sendo todas negativas (Tabela 5).

Nas 120 amostras positivas observou-se que a técnica de Faust e cols.⁵ detectou parasitas em 106, enquanto a técnica de sedimentação espontânea em 100 (Tabela 5). Em 86 exames, ambos evidenciaram estruturas parasitárias de pelo menos um agente, sendo que em 31 exames ocorreu a detecção de espécies parasitárias diferentes. A técnica de Faust e cols.⁵ não foi capaz de detectar *Ascaris lumbricoides* em 6 amostras, enquanto Lutz em apenas 2 nos 36 exames positivos para este agente. Com relação a *Trichuris trichiura* observou-se que a técnica de Faust e cols.⁵ não apresentou eficiência em 6/32 amostras, enquanto Lutz em 12/32 amostras.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A taxa média de adesão observada neste estudo de 64,1% é considerada boa, embora abaixo do esperado, uma vez que os exames eram gratuitos. Esta taxa de participação demonstra que possivelmente a prevalência do parasitismo intestinal entre crianças que frequentam as creches comunitárias de Niterói é superior a encontrada (55%), indicando também a sensibilização moderada da comunidade frente à necessidade do diagnóstico e da importância das parasitoses intestinais em

Tabela 4. Distribuição dos resultados observados em função da idade ao exame de fezes de 218 crianças que apresentaram positividade por pelo menos uma técnica das creches comunitárias de Niterói/RJ.

	Crianças											Total
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	
Positivo	0	8	23	27	19	18	8	5	3	3	2	116
Negativo	2	16	22	24	15	12	4	2	0	0	1	98
Total	2	24	45	51	34	30	12	7	3	3	3	214

Tabela 5. Resultado da análise das amostras de 218 crianças pelas técnicas de Faust e cols., Lutz e Baermann & Moraes.

Técnica	Positivo	Negativo
Faust e cols.	20	14
Lutz	14	20
Faust e cols. e Lutz	86	64
Total	120	98
Baermann & Moraes	0	192

crianças. Em um estudo sobre a saúde do idoso no Novo México, Romero *et al.*¹⁷ obtiveram uma taxa de participação de 54% dos indivíduos recrutados (883/1666), enquanto Barnett *et al.*¹ obtiveram uma participação de 64,5% dos membros da Academia Americana de Pediatria em um estudo realizado através de questionário sobre os programas de saúde nas escolas. Por outro lado, Ivatts *et al.*¹⁰ em um estudo sobre as percepções e práticas de agentes de viagens frente às doenças adquiridas em viagens obtiveram uma participação de 87% das agências consultadas.

A positividade de 55% nas crianças foi superior a observada por Santos *et al.*¹⁸ num estudo em creches do Rio de Janeiro onde a positividade foi de 35,04% e aos resultados obtidos por Oliveira *et al.*¹⁵ em Ribeirão Preto-SP que foi de 29,8%. Porém esta positividade assemelha-se aos resultados de Ferraroni *et al.*⁶ que foi de 68,6% numa avaliação coproparasitológica em pré-escolares filhos de operários do Distrito Industrial de Manaus-AM.

Giardia lamblia foi o parasita mais prevalente entre as crianças ocorrendo em 21,4% (46/218) dos exames com ou sem associação com outros agentes, incidindo mais em crianças com idades entre 2 a 4 anos. Estes dados concordam com os de Santos *et al.*¹⁵, Ferraroni *et al.*⁶, de Machado *et al.*¹² que encontraram prevalência de *Giardia lamblia* de 23,93%, 16,9% e 61,1%, respectivamente. Esta alta ocorrência é devida, principalmente à água não potável, destino inadequado do lixo, hábito de ingerir hortaliças cruas e dormitórios coletivos segundo Cardoso *et al.*³. Black *et al.*² sugerem que a giardíase, segundo dados epidemiológicos, pode ser transmitida por via fecal-oral entre crianças que freqüentam creches e destas a seus familiares. Neste estudo a alta freqüência encontrada pode ter sido oriunda tanto de uma transmissão inter-pessoal entre as crianças quanto de contaminações de alimento e/ou água uma vez que as comunidades carecem de rede de saneamento básico e abastecimento de água potável em grande número de residências.

O encontro de *B. hominis* em 3 crianças demonstra a circulação deste parasita neste grupo da população concordando com os dados de Guimarães e Sogayar⁸, embora tenham sido encontrados poucos casos.

O monoparasitismo ocorreu em 57,5% das crianças estudadas, ao contrário do observado por Santos *et al.*¹⁸, que evidenciou maior freqüência de poliparasitismo (56,1%).

Com relação aos helmintos *A. lumbricoides* foi o mais prevalente, ocorrendo em 36 das 218 crianças seguido pelo *T. trichiura* (32), estando associados em 17 exames. Estes dados concordam com os resultados obtidos por Oliveira *et al.*¹³, Santos *et al.*¹⁵, Ferraroni *et al.*⁶ (1991), Machado *et al.*¹² e Tavares-Dias & Grandini¹⁹.

Foi detectado apenas um caso de enterobiose através dos exames realizados, sendo tal fato esperado uma vez que não foi utilizada uma metodologia apropriada para o seu diagnóstico.

Não foram encontradas larvas de *Strongyloides stercoralis* pelo método de Baermann & Moraes¹⁴, altamente específico para larvas de nematóides, nem houve o encontro de ovos de ancilostomídeos, sugerindo que nas áreas estudadas, possivelmente, não está ocorrendo a circulação de parasitas que infectem o homem através de mecanismos ativos cutâneos, talvez devido ao uso de calçados pela população e um menor contato direto com solo contaminado por larvas destes helmintos.

Quanto à indicação dos métodos, a pequena diferença observada na sensibilidade na detecção de estruturas parasitárias por uma das técnicas eleitas e a evidênciação de estruturas parasitárias de espécies diferentes no mesmo material por uma ou outra técnica sugere a necessidade da utilização de mais de uma técnica com fundamentos diferentes para fomentar uma maior sensibilidade coprodignotica como relatado por Mesquita *et al.*¹³.

Após a obtenção dos resultados dos exames, estes foram entregues a Fundação Municipal de Educação de Niterói, a direção da Creche e aos pais para serem encaminhados ao pediatra do Posto de Saúde ou médico de família que atende a Comunidade visando o tratamento gratuito. Na creche foi apresentada uma palestra aos pais e funcionários abordando transmissão das enteroparasitoses, os resultados obtidos na creche e como a comunidade pode atuar para reduzir ou evitar estas infecções.

Apesar destas atividades desenvolvidas com as comunidades, os resultados demonstram a necessidade da implementação de medidas de saneamento básico e programas contínuos, concomitantemente, visando a educação sanitária, acompanhamento rotineiro das infecções parasitárias bem como participação e verificação da eficácia do tratamento preconizado. A associação destas medidas possibilitaria uma melhoria da condição de vida das crianças, bem como da comunidade, o que, conseqüentemente, reduziria em alguns casos o agravamento da desnutrição, melhorando o aprendizado e o desenvolvimento destas crianças.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Municipal de Educação de Niterói por autorizar a realização do trabalho e fazer os primeiros contatos com as creches, as diretoras e funcionários das creches por nos auxiliarem nos contatos com os pais e estes que participaram na coleta das amostras e das palestras de esclarecimento.

Uchôa, C.M.A. *et al.* Intestinal parasitism: prevalence in day-care centers of Niteroi city, Rio de Janeiro – Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):97-101, 2001.

ABSTRACTS. A parasitological survey of children from five communitary day-care centers from Niteroi/RJ – Brazil, was conducted in 1999. Of 218 children surveyed, 120 (55%) had positive samples for intestinal parasite. Among protozoa, *Giardia lamblia* was by far the most common species, detected in 38,3% of the cases, followed by *Entamoeba coli* (26,6%), *Endolimax nana* (17,5%), *Entamoeba histolytica* (11,6%) and *Blastocystis hominis* (2,5%). For the helminths, *Ascaris lumbricoides* (30%) was the most frequent, followed by *Trichuris trichiura* (26,6%), *Hymenolepis nana* (0,8%) and *Enterobius vermicularis* (0,8%). Monoparasitism was observed in 57,5% of the positive children. For the day-care center staff, *Entamoeba coli* was the specie with higher prevalence, probably due to ingestion of cysts in hands, food or water contaminated with human faeces. The high incidence of intestinal parasite, specially for protozoa, suggests the possibility of person-to-person transmission between children or the occurrence of ingestion of contaminated food or water. These datas show the necessity of sanitary and educational programmes implementation for a better condition of children's lifes from communitary areas of Niteroi/RJ.

KEY-WORDS. Intestinal parasite, day-care center, children, diagnosis, Niteroi, Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

1. Barnett, S.; Duncan, P.; O'Connor, K.G. Pediatricians' response to the demand for school health programming. **Pediatrics**, 103:44-5, 1999.
2. Black, R.E.; Dykes, A.C.; Sinclair, S.P.; Wells, J.G. Giardiasis in Day-care centers: evidence of person-to-person transmission. **Pediatrics**, 60:486-491, 1977.
3. Cardoso, G.S; Santana, A.D.C.; Aguiar, C.P. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no Município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 28:25-31, 1995.
4. Cartwright, C.P. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. **J. Clin. Microbiol.**, 37:2408-2411, 1999.
5. Faust, E.C. *et al.* A critical study of clinical laboratory technics of the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I – Preliminary communication. **Am. J. Trop. Med.**, 18:169, 1938.
6. Ferraroni, M.J.R. *et al.* Prevalência de enteropatias na cidade de Manaus. **J. Pediatr.**, 67:24-28, 1991.
7. Ferreira, C.B.; Merçal J.R.O. Enteroparasitoses em escolares do Distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo piloto. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30:373-377, 1997.
8. Guimarães, S.; Sogayar, M.I.L. *Blastocystis hominis*: occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 88:427-429, 1993.
9. Hlaing, T. Ascariasis and childhood malnutrition. **Parasitology**, 107:S125-S136, 1993.
10. Ivatts, S.L.; Plant, A.J.; Condon, R.J. Travel Health: perceptions and practices of travel consultants. **J. Travel Med.**, 6:76-80, 1999.
11. Lutz, A.O. *Schistosomum mansoni*, segundo observações feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 11:121-155, 1919.
12. Machado, R.C.; Marcari, E.L.; Cristante, S.F.V.; Carareto, C.M.A. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32:697-704, 1999.
13. Mesquita, V.C.L. *et al.* Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32:363-366, 1999.
14. Moraes, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista Serviço de Saúde Pública**, 1:507-624, 1948.
15. Oliveira, T.B. *et al.* Enteroparasitoses observadas em crianças que freqüentam uma creche de Ribeirão Preto. **Medicina**, 10:7-10, 1979.
16. Rey, L. Métodos e técnicas Usuais em Parasitologia. In: Rey L. **Parasitologia**. 2ª edição. Editora Guanabara Koogan, 1991. p. 681-693.
17. Romero, L.J. *et al.* Outcome of recruitment and report on participation rate in the New Mexico Elder Health Survey. **Ethn. Disease**, 8:350-9, 1998.
18. Santos, C.S. *et al.* Inquérito parasitológico pelo exame de fezes em crianças pertencentes a creches no Rio de Janeiro. **J. Pediatr.**, 56:97-100, 1984.
19. Tavares-Dias, M.; Grandini, A.A. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32:63-65, 1999.

Recebido em 24/07/2000; Aprovado em 04/10/2001

Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva

Evaluation of sulphur dioxide and microbiological quality of conserved mushrooms

Neura BRAGAGNOLO^{1*}
Cláudia A. SILVA²
Marta H. TANIWAKI²

RIALA6/899

Bragagnolo, N.; Silva C.A.; Taniwaki, M.H. Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):103-107, 2001.

RESUMO. Cogumelos são alimentos bem apreciados e seu consumo tem aumentado substancialmente. Para estender a vida de prateleira a adição de dióxido de enxofre ou sais de sulfitos que o produzam é usada por atuar como branqueador e conservador. A Resolução nº 04/88 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde permite a adição de no máximo 50 mg/kg de dióxido de enxofre. A ausência de *Salmonella* em 25 gramas de amostra e um máximo de 200 bactérias coliformes fecais por g são requeridos na Resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. Com o propósito de avaliar os teores de sulfito, pH, e a qualidade microbiológica de cogumelos em conserva foram analisadas 108 amostras sendo 25 industrializadas, 36 provenientes de produtores da região de Mogi das Cruzes e 47 lotes importados da China. O método utilizado para análise de dióxido de enxofre foi de Monier-Williams, cujo limite de detecção foi de 0,15 mg/kg e a recuperação de 91%. Os teores de dióxido de enxofre variaram de não detectado a 1052 mg/kg sendo que 68% das amostras industrializadas, 61% das provenientes de produtores e 23% dos lotes importados encontraram-se acima do limite permitido. O valor de pH variou de 2,60 a 5,35. Todas as amostras de cogumelos encontraram-se em acordo com padrões microbiológicos. Os altos níveis de dióxido de enxofre encontrados evidenciam uma preocupação de saúde pública. Os resultados microbiológicos sugerem que níveis baixos de dióxido de enxofre são suficientes na conservação do produto, não justificando as doses encontradas.

PALAVRAS-CHAVE. Cogumelos, dióxido de enxofre, análise microbiológica.

INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis utilizados em conserva são fungos pertencentes à classe dos basidiomicetes, sendo que a espécie cultivada mais comum é o *Agaricus campestris*. O

consumo de cogumelos em conserva no Brasil tem crescido nos últimos anos, principalmente, após a abertura do mercado externo. Para serem comercializados em conserva, estes sofrem a adição direta de dióxido de enxofre, ou indiretamente de sais de sulfitos que o produzam (sulfito de sódio, bissulfito de

^{1*} Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

² Instituto de Tecnologia de Alimentos, Av. Brasil, 2880, CEP 13073-001, Campinas/SP, Brasil, e-mail: mtaniwak@ital.org.br

* Endereço para correspondência: C.P. 6121, 13083-970, Campinas/SP. e-mail: neura@fea.unicamp.br

sódio, bissulfito de potássio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio). O dióxido de enxofre (SO_2) atua como branqueador e conservador sendo o mais utilizado e eficaz em alimentos e reconhecido como GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) pelo Food and Drug Administration (FDA)³. Os compostos de enxofre são considerados seguros quando usados de acordo com as boas práticas de manufatura e dentro dos níveis recomendados para cada alimento⁶. A resolução 04/88 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde⁴ permite a adição de no máximo 50 mg/kg de dióxido de enxofre em conservas de cogumelos. Estudos sobre os níveis de dióxido de enxofre em cogumelos são escassos e existem evidências de haver um abuso na adição deste conservador, além dos limites permitidos pela legislação brasileira. Por outro lado, o preparo incorreto dos cogumelos em conserva pode aumentar a carga microbiana, levando o produto à deterioração em poucos dias. De acordo com a Resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA)⁴ do Ministério da Saúde, ausência de *Salmonella* em 25 gramas e o máximo de 200 bactérias do grupo coliforme de origem fecal por grama de amostra é exigido para se considerar dentro dos padrões microbiológicos. Mais recentemente, a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001⁴ estabeleceu os limites de ausência de *Salmonella* em 25 g, máximo de 100 bactérias do grupo coliformes que crescem à temperatura de 45 °C por grama e máximo de 1000 bactérias *Staphylococcus coagulase* positiva por grama para cogumelos em conserva. Contudo, esta resolução ainda não estava vigente na época em que este trabalho foi desenvolvido.

Os sulfitos têm diversas funções nos alimentos e bebidas, atuando como agentes sanitizantes, antioxidantes, antifermentativos, antifúngicos, inibidores do escurecimento e da deterioração bacteriana. Perda de sulfito ocorre durante o processamento, na estocagem, e na preparação doméstica. Os sulfitos podem reagir com vários ingredientes e isto pode diminuir a quantidade de sulfito disponível no alimento. A lavagem com água não remove o sulfito e o cozimento irá reduzir, mas não eliminá-lo totalmente³.

Os efeitos biológicos dos agentes sulfitantes não estão completamente elucidados. Segundo a Federação das Sociedades Americanas para Experimentos Biológicos⁸, os sulfitos não são prejudiciais à maioria das pessoas, senão aos asmáticos, hipersensíveis aos sulfitos e aos alérgicos do tipo agudo. Os sintomas ou reações relacionadas com a ingestão de sulfitos podem ser vermelhidão, urticária, pressão sanguínea baixa, problemas respiratórios, distúrbio gastrointestinal, dermatite, náusea, diarreia, choque anafilático, ataque asmático agudo e perda de consciência. No entanto, o FDA tem registrado algumas mortes (27 mortes até abril de 1988) atribuídas ao consumo de alimentos contendo sulfitos⁶ e determinou que alimentos contendo mais de 10 ppm de agentes sulfitantes sejam declarados no rótulo⁷. A ingestão diária aceitável de dióxido de enxofre, para o homem é de 0,7 mg/kg de peso corpóreo¹⁰ e

estima-se que a ingestão diária de sulfitos esteja em torno de 180 mg³.

Os métodos para a determinação de sulfitos em alimentos variam desde análises diretas muito simples até alguns métodos indiretos muito sofisticados. O método de Monier-Williams¹ tem sido o método oficial para monitorar o uso de sulfito⁷. Muitos dos métodos empregados são, essencialmente, oriundos de modificações do primeiro procedimento de Monier-Williams, desenvolvido em 1927 e otimizado em 1986 para obtenção de níveis ≥ 10 ppm^{7,14}. Fazio e Warner⁶ revisando vários métodos analíticos para determinação de sulfitos em alimentos concluíram que o método de Monier-Williams é ainda o mais adequado.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: (1) determinar os níveis de dióxido de enxofre nos cogumelos em conserva encontrados no mercado, a fim de verificar o nível de exposição dos consumidores; (2) verificar a qualidade microbiológica dos cogumelos em conserva comercializados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de cogumelos

Foram analisadas 25 amostras de cogumelos em conservas industrializados adquiridos no mercado de Campinas, 36 provenientes de produtores da região de Mogi das Cruzes e 47 importados da China.

Determinação de dióxido de enxofre

Para análise de dióxido de enxofre e de pH os cogumelos drenados (em torno de 600 g) foram homogeneizados em liquidificador até a obtenção de uma pasta. Foi utilizado o método de Monier-Williams modificado por Shipton¹² o qual consiste, basicamente, em acidificar 200 g de cogumelos com HCl (10 N) e destilar por 2 horas em corrente de N_2 ajustando a vazão em 20 bolhas por minuto. O N_2 arrasta o SO_2 produzido para o peróxido de hidrogênio 3% neutro e frio. O SO_2 reage com peróxido de hidrogênio formando H_2SO_4 , o qual é titulado com NaOH 0,1 N ou 0,01 N até atingir o ponto de viragem de vermelho para amarelo (indicador vermelho de metila 0,25%).

Para verificar a eficiência do método determinou-se o limite de detecção, recuperação, tempo de destilação necessário e a influência do pH da solução contendo cogumelos. A recuperação foi realizada em duplicata adicionando-se 50 mg de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) em 1 kg de cogumelos. O limite de detecção foi realizado com diluição sucessiva de uma solução padrão de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ adicionada a amostra, destilada e titulada. A concentração de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ entre a que pode ser titulada (volume usado $\geq 0,5$ ml) e a que não respondeu a titulação foi calculado como limite de detecção.

Determinação de pH

Seguiu-se o método potenciométrico do Instituto Adolfo Lutz⁹, utilizando-se um potenciômetro marca Orion (330).

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas de *Salmonella* e coliformes fecais foram realizadas de acordo com a metodologia recomendada por Vanderzant e Splittstoesser¹³. Para determinação de *Salmonella*, uma alíquota de 25 g de cogumelos foi colocada no caldo de pré-enriquecimento, água peptonada tamponada e incubada por 35 °C/24 h. Após este período, a amostra foi passada para o enriquecimento seletivo no caldo tetracionato e caldo selenito cistina e incubada por 35 °C/24 h. Em seguida a amostra foi estriada em três meios de diferenciação ágar entérico de Hectoen, ágar xilose lisina desoxicilato e ágar bismuto sulfito, a leitura foi feita após incubação à 35 °C/24 h. As colônias suspeitas foram submetidas à série bioquímica de *Salmonella* e o resultado expresso em presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g.

Quanto a coliformes fecais, uma amostra de 25 g foi homogeneizada com 225 ml de água peptonada e em seguida foi feita uma diluição seriada. As diluições foram inoculadas em tubos múltiplos de caldo lauril sulfato triptose e incubadas à 35 °C/48 h. Após este período os tubos positivos foram inoculados em caldo *E. coli* e incubados à 44,5 °C/24 h. A contagem seguiu a técnica do número mais provável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O limite de detecção obtido no presente trabalho para o método Monier-Williams modificado por Shipton¹² foi de 0,15 mg/kg sendo bem menor que 10 mg/kg descrito na literatura⁷. Perfetti *et al.*¹¹ também encontraram baixos valores de SO₂ (0,8 mg/kg de uva) utilizando um dos métodos de Monier-Williams modificado. A recuperação do método foi de 91,1 ± 0,6% (CV = 0,7). O resultado obtido de recuperação pode ser considerado ótimo visto que Warner *et al.*¹⁴ encontraram recuperação de 75% e Beelman *et al.*² entre 68,4 e 72%, ambos em cogumelos, utilizando-se o método de Monier-Williams modificado. Verificou-se que o tempo necessário para a destilação total foi de 2 horas, embora o método oficial da AOAC¹ indique como tempo total 2,4 horas e o método de Monier-Williams modificado por Shipton¹², recomenda 30 minutos. Muitos trabalhos relatam a influência do pH no resultado de dióxido de enxofre total. No presente trabalho foi investigado o pH da solução contendo a amostra, o qual não mostrou necessidade de ser modificado. Nos vários pH testados o valor obtido de SO₂ foi semelhante.

Das 108 amostras analisadas, 50 (46%) apresentaram teor de dióxido de enxofre acima do limite permitido. Altos níveis de dióxido de enxofre foram encontrados em algumas amostras, verificando-se valores de até 1052 mg/kg. Das 25 amostras comerciais analisadas, 17 (68%), encontraram-se acima dos 50 mg/kg permitidos pela legislação vigente, sendo que os níveis variaram de não detectado (< 0,15 mg/kg) a 1052 mg/kg (Figura 1). Em relação às amostras provenientes dos produtores, os teores de SO₂ variaram de não detectado a 1007 mg/kg, sendo que 61% das amostras apresentaram valo-

res acima do permitido (Figura 2). Dos lotes importados utilizados como matéria prima para posterior processamento, os valores variaram de não detectado a 904 mg/kg, sendo que 23% das amostras ficaram acima dos níveis aceitos (Figura 3). Observou-se que nas amostras comerciais a maioria não declarava no rótulo o uso de dióxido de enxofre.

Beelman *et al.*² determinaram a quantidade de dióxido de enxofre em cogumelos frescos após lavagem com uma solução de 1000 ppm de sulfito de sódio, tendo sido encontrado níveis iniciais bem baixos, média de 48,3 ppm e com subsequente declínio a uma razão logarítmica. Após 24 horas de estocagem, os níveis reduziram para quantidades não detectadas (< 10 ppm). Daniels *et al.*⁵ analisando sulfitos em vários alimentos, encontraram valores de 3722 ppm em frutas secas; embora, para outros alimentos como melado e batatas em lata os valores encontrados foram bem menores (4,6 ppm até não detectado). Yabiku *et al.*¹⁵ analisaram 473 amostras de sucos de frutas comercializadas no Brasil, sendo que 51% apresentaram níveis de dióxido de enxofre acima do limite máximo permitido pela

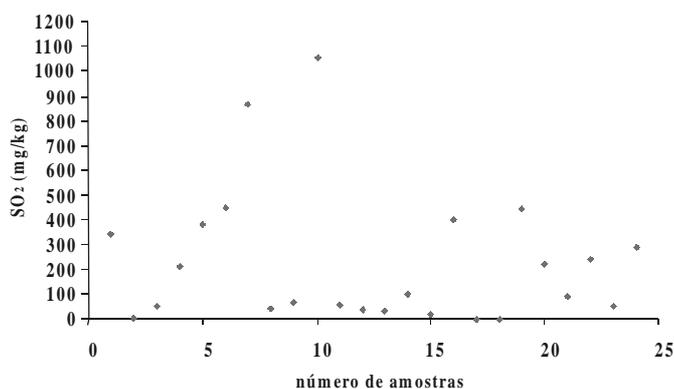


Figura 1. Níveis de SO₂ (mg/Kg) em cogumelos em conserva industrializados.

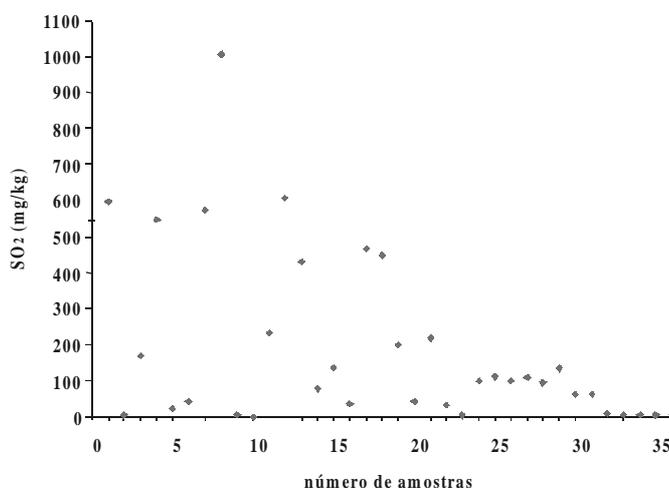
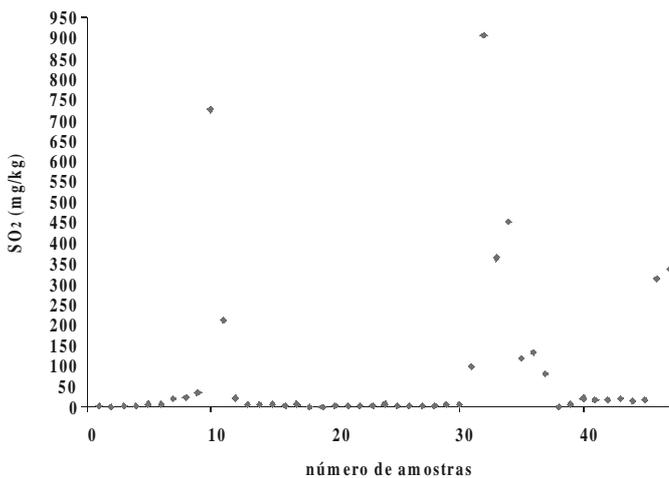


Figura 2. Níveis de SO₂ (mg/Kg) em cogumelos em conserva provenientes de produtores da região de Mogi das Cruzes.



- Brasília, 24 de julho de 1978. Seção I, p.11499-11527. Resolução RDC 12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diário Oficial da União, Brasília, 02 de janeiro de 2001. Seção 1, p.45-53.
5. Daniels, *et al.* Survey of sulphites determined in a variety of foods by the optimized Monier-Williams method. **Food Addit. Contam.**, 9(3):283-9, 1992.
 6. Fazio, T.; Warner, C.R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. **Food Addit. Contam.**, 7(4):433-54, 1990.
 7. FDA. Food and Drug Administration. **Food labeling; declaration of sulfiting agents, final rule. Federal Register**, 51, 25012-25020, 1986.
 8. FASEB. The reexamination of GRAS status of sulfiting agents, Report prepared for Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA. Federation of American Societies for Experimental Biology, 1985.
 9. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ed. São Paulo, 1985, 533p.
 10. JECFA. Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. **27th Report. Geneva, WHO**, 1983, p.20-21. (Technical Report Series 696).
 11. Perfetti, G.A.; Joe Jr., F.L.; Diachenko, G.W. Liquid chromatographic determination of sulfite in grapes and selected grape products. **J. Assoc. Of. Anal. Chem.**, 72(6):903-906, 1989.
 12. Shipton, J. Estimation of sulphur dioxide in dried foods. **Food Preservation Quarterly**, 14:54-6, 1954.
 13. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3ed. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219p.
 14. Warner, C.R. *et al.* T. Reevaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food. **J. Assoc. Of. Anal. Chem.**, 69(1):3-5, 1986.
 15. Yabiku, H.Y. *et al.* O. Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializadas no Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 47(1/2):64-75, 1987.

Recebido em 15/12/2000; Aprovado em 04/10/2001

Avaliação do teor de lipídios em queijos Minas Frescal industrializados e artesanais e em ricotas comercializados na região de Botucatu/SP

Lipid level evaluation in industrialized and handmade Minas Frescal cheese and ricottas from the region of Botucatu/SP

Cristina D. CRUZ¹
Maria Isabel F. V. GOMES^{1*}

RIALA6/900

Cruz, C.D.; Gomes, M.I.F.V. Avaliação do teor de lipídios em queijos Minas Frescal industrializados e artesanais e em Ricotas comercializados na região de Botucatu/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):109-112, 2001.

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo avaliar o teor de lipídios em 12 marcas de queijos Minas Frescal industrializados, 9 de queijos artesanais e 10 de ricotas comercializadas na região de Botucatu/SP. Para avaliação de lipídios foi utilizado o método de Gerber. As informações contidas nas embalagens de cada produto foram comparadas com os resultados obtidos. Todas as marcas de queijo Minas Frescal apresentaram teor de lipídios acima do declarado nas embalagens (16-18%). Entre os queijos artesanais, de um total de 9 marcas, 4 apresentavam uma média de teor de lipídios de 16%, semelhantes ao indicado nas embalagens dos queijos Minas Frescal industrializados. Já as ricotas, todas as marcas analisadas apresentavam teor de lipídios (%) fora do padrão médio estabelecido. Frente aos resultados obtidos, torna-se necessário um maior controle sobre a produção industrial brasileira destes tipos de queijos.

PALAVRAS-CHAVE. queijo minas frescal; ricota; teor de lipídios; rotulagem.

INTRODUÇÃO

Queijo Minas Frescal é definido pela Portaria nº 146² como queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. Nem todos os componentes do leite estão presentes no queijo, pois a caseína ao aglutinar-se separa a fase sólida da água resultando em um concentrado protéico gorduroso. As

globulinas, albuminas, lactose e algumas vitaminas e sais permanecem na fase líquida formando junto com a água, o soro. Com relação aos sais minerais, os queijos fabricados através de coagulação enzimática retêm mais da metade do cálcio e do fósforo existente no leite. Sob o ponto de vista vitamínico o queijo é uma ótima fonte de vitamina A presente na gordura. Estes produtos derivados do leite são uma excelente fonte de aminoácidos essenciais de acordo com Lawrie, citado por Tadini et al.¹¹. Já a ricota é um queijo obtido da concentração da albumina

¹ Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP.

^{1*} Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Ciências Agrônomicas – Campus de Botucatu – UNESP, Caixa Postal 237 – CEP 18603-970 – Botucatu/SP.

provocada por calor e por ácidos, tendo como matéria-prima o soro e não o leite.

No queijo Minas Frescal deve-se trabalhar com um leite que apresente um teor de gordura bem definido a fim de permitir a padronização da qualidade do produto. Um trabalho desenvolvido por Magalhães et al.⁶ constatou a não padronização do teor de gordura dos leites que poderiam ser utilizados para fabricação dos queijos. As indústrias de queijo Minas Frescal procuram produzir os queijos com o máximo de umidade a fim de aumentar o rendimento, no entanto levam a um menor tempo de conservação do produto.

As estatísticas oficiais não retratam a realidade atual do volume de produção de queijos artesanais no Estado de Minas Gerais, mas sabe-se de sua grande importância social. Além disso, não existe uma metodologia que viabilize as diferenciações de autenticidades e de origens para os queijos artesanais segundo Vargas et al.¹². O queijo Minas Frescal é o terceiro queijo mais consumido no país segundo Albuquerque e Castro, citados por Saboya et al.⁹. A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil, onde os tipos de maior consumo compreendem o Minas Frescal e a mussarela segundo Behmer e Felício Filho, citados por Oliveira et al.⁷.

O queijo Minas Frescal é de fabricação simples e de baixo custo, representando a maioria dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias, sendo comercializados em sacos plásticos comum, amarrados ou fechados com um fecho metálico, porém sem usar vácuo de acordo com Hoffmann et al.⁴. Os queijos Minas Frescal e Ricota são tidos como queijos de baixo teor de lipídios. A quantidade de lipídios presente em 100 g da amostra úmida do produto deve estar expresso em seu rótulo. O desenvolvimento de algumas doenças como a aterosclerose em particular, está intimamente ligada com o nível de colesterol no sangue que é dependente do teor de gordura dos alimentos ingeridos, incluindo os derivados do leite⁸.

Segundo a legislação brasileira¹, o valor de lipídios pode ser expresso no extrato seco, o que não informa diretamente ao consumidor a quantidade de lipídios que está ingerindo, pois o alimento sempre é consumido na sua forma úmida. Segundo Schmidt¹⁰ a porcentagem de lipídios deveria ser obrigatoriamente na base úmida.

De acordo com Portaria nº 146² o queijo Minas Frescal apresenta um teor de lipídios no extrato seco entre 25,0% e 44,9%. Já para a Ricota fresca, o teor de lipídios deveria ser zero, por ser um produto obtido do soro. Para um maior rendimento a Legislação Brasileira permite ser adicionado leite até 20% do volume do soro a ser utilizado, levando a um teor de lipídios no total da massa de 1-2% em média.

O soro do queijo representa uma fonte potencial de recursos para a indústria de laticínios. No entanto, ainda é tratado mais como poluente do que como matéria prima. Em estudo realizado por Ferreira³ a produção brasileira de soro está estimada em cerca de 650-675 mil toneladas de soro advindo apenas da fabricação de queijo. O reconhecimento da qualidade dos componentes do soro, bem como a divulgação de tra-

balhos científicos referentes às propriedades especiais das proteínas, sais minerais, vitaminas, lactose levaram outros países ao crescente interesse pela utilização do soro na indústria de alimentação animal e humana, farmacêutica e química.

Este trabalho teve por objetivos quantificar o teor de lipídios em queijos Minas Frescal industrializados, artesanais e em Ricotas comercializados na região de Botucatu/SP. Comparou-se depois os resultados obtidos e as informações contidas nas embalagens (composição/100g) de cada produto com o intuito de saber se eram coincidentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os queijos foram obtidos em diversos estabelecimentos como padarias, supermercados e mercearias da região de Botucatu/SP. A amostragem constituiu-se de: 12 marcas de queijos Minas Frescal industrializado, 9 artesanais e 10 marcas de Ricotas. Dentro de cada grupo de queijo, as marcas receberam letras como designação: queijos Minas Frescal industrializados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L e M; queijos Minas artesanais A, B, C, D, E, F, G, H e I e as Ricotas A, B, C, D, E, F, G, H, I e J. Foram analisados 3 diferentes lotes de queijos para cada marca, com diferentes datas de fabricação. Os queijos artesanais foram adquiridos sempre dos mesmos estabelecimentos. Os dois queijos Minas Frescal industrializados, marcas B e D, declaravam no rótulo serem produtos lights.

De cada amostra pesaram-se 3 gramas em recipiente próprio do butirômetro. O teor de lipídios de cada queijo foi assim quantificado pelo Método de Gerber, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁵, em duplicata.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, através da comparação das médias obtidas dentro das diferentes marcas do mesmo tipo de queijo. Utilizou-se o Teste F de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as médias de teor de lipídios (%) na amostra úmida em queijos Minas Frescal industrializados. As marcas B e D apresentaram uma padronização entre si e com as marcas F e H, as quais eram denominadas de queijos Magros em suas embalagens. Observando-se o desvio padrão principalmente das marcas C, H e J, pode-se notar a falta de padronização destas marcas nos diferentes lotes. Para o consumidor significa teores variáveis de lipídios ao consumir a mesma marca proveniente de lotes diferentes.

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a marca J e todas as outras marcas, sendo desta, o maior valor de lipídios encontrado (30,1%). As outras marcas podem ser agrupadas da seguinte maneira por não apresentarem diferenças significativas entre suas médias: B, D, H e F (14,9; 14,5; 16,6 e 13%); A, E e I (23,7; 23,3 e 23,7%) e C, G, L e M (19,5; 20,6; 20,2 e 20,5%).

Na Figura 2 comparou-se as informações sobre o teor de

lipídios (%) contidas nas embalagens de cada produto e os valores obtidos nos experimentos. As marcas F, H, J e M não apresentavam esta informação em suas embalagens. Já os resultados obtidos das marcas A, C, E, G, I e L não correspondiam ao que a embalagem informava ao consumidor. Embora o teor de

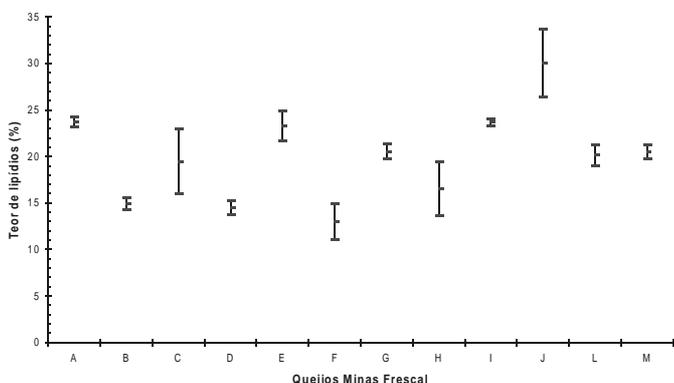


Figura 1. Média e desvio padrão do teor de lipídios (%) na amostra úmida de queijos Minas Frescal comercializados na região de Botucatu/SP.

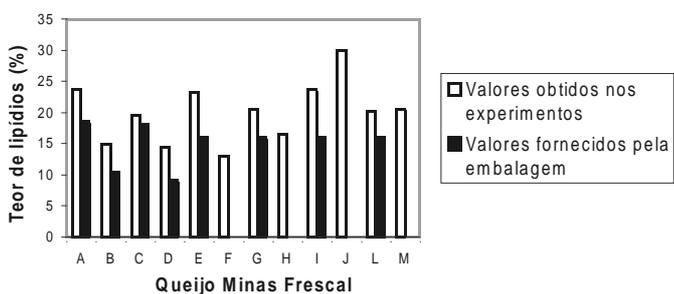


Figura 2. Comparação entre o teor de lipídios (%) obtido nos experimentos (base úmida) e os dados fornecidos pela embalagem (base seca) de queijos Minas Frescal comercializados na região de Botucatu/SP.

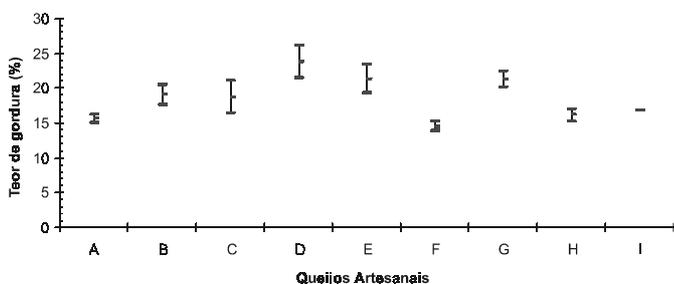


Figura 3. Média e desvio padrão do teor de lipídios (%) na amostra úmida em queijos Minas Frescal artesanais comercializados na região de Botucatu/SP.

lipídios apresentado na embalagem encontra-se na base seca, segundo estabelece a legislação, observa-se que os resultados obtidos neste trabalho foram sempre maiores quando comparados com as informações da composição fornecida também na embalagem dos queijos.

Na Figura 3 encontram-se as médias e desvio padrão do teor de lipídios dos queijos artesanais. As marcas A, F, H e I apresentaram uma média de teor de lipídios na amostra úmida de 16%, semelhantes ao indicados nas embalagens dos queijos Minas Frescal industrializados das marcas E, G, I e L. (Fig. 2). Esta comparação foi feita por não haver informações sobre teor de lipídios na amostra úmida para queijos artesanais. Pode-se observar desvios padrões inferiores aos encontrados em queijos industrializados, indicando uma maior padronização em sua produção. Houve diferença significativa entre as médias (tab1), sendo o menor valor observado de 14,5% (F) e o maior valor de 23,7% (D).

A Figura 4 relaciona os valores de lipídios encontrados para as Ricotas. O alto valor encontrado para o desvio

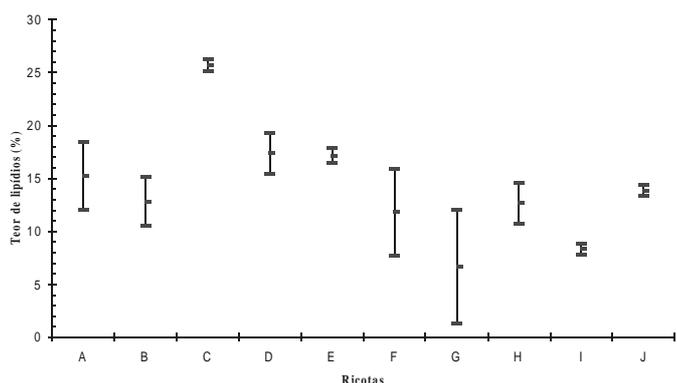


Figura 4. Médias e desvio padrão do teor de lipídios (%) na amostra úmida de Ricotas comercializadas na região de Botucatu/SP.

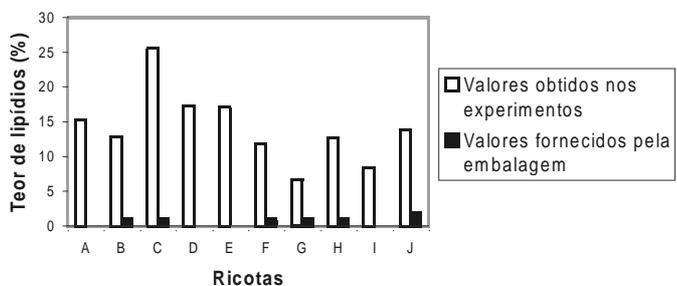


Figura 5. Comparação entre o teor de lipídios (%) obtido nos experimentos (base úmida) e o valor fornecido pela embalagem (base seca) de Ricotas.

padrão indica falta de controle de produção. Apenas a marca C apresentou porcentagem significativamente maior, diferindo de todas as outras com um valor de 25,7% de teor de lipídios. As outras marcas tiveram porcentagens variando de 6,7 a 17,4%.

A Figura 5 compara os valores obtidos nos experimentos e os valores fornecidos pelas embalagens, sendo que as marcas A, D, E e I não apresentavam esta informação.

Nota-se que os teores de lipídios encontrados em Ricota do presente trabalho também foram maiores que os declarados no rótulo, os quais estão expressos na base seca.

CONCLUSÕES

As amostras de queijo Minas Frescal industrializadas apresentaram em 7 das 12 marcas, um teor de lipídios (%) dentro do padrão médio estabelecido de 21-23%, porém nenhuma estava de acordo com a informação contida na embalagem. Dos 9 queijos artesanais analisados, 5 estavam dentro do padrão estabelecido para queijos Minas Frescal. Todas as 10 marcas de Ricotas analisadas apresentavam teor de lipídios (%) fora do padrão médio estabelecido de 1-2%. Frente aos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de um maior controle sobre a produção industrial brasileira de queijos.

RIALA6/900

Cruz C.D.; Gomes, M.I.F.V. Lipid level evaluation in industrialized and handmade Minas Frescal cheese and ricottas from the region of Botucatu/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):109-112, 2001.

ABSTRACT. This present work aims to evaluate the level of lipids out of the total of mass, within 12 different Minas Frescal industrialized brands and 10 varieties of Ricotta from the region of Botucatu/SP. Information included on the packages of each product were compared with the results in order to know whether the consumer is being well informed or not. The Gerber method was used to evaluate the lipids. Results were submitted to statistical analysis using the "F Test of Variance Analysis" and Tukey test. Industrialized varieties of Minas Frescal cheese showed, in 7 out of the 12 brands, a lipid level (%) fitting the established average standard, however, none of them matched the information described in their respective packages (16%-18%). Among the handwork cheeses, 5 out of 9, matched the established standard for Minas Frescal cheeses. The ricottas, all the 10 brands analyzed here did not match the established average standard of lipids grade (%). Face to the obtained results, it's up to the population to demand a more effective control of the industrialized Brazilian production.

KEY WORDS. Minas cheese. ricotta. lipids. labeling.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Leis, Decretos, etc. Decreto 30691 de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial**, Rio de Janeiro, 07 de julho de 1952, alterado pelo decreto nº 1255 de 25 de junho de 1962, Brasília, Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Ministério da Agricultura, 1980, 166p.
2. Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 146 de 07 de Março de 1996. Aprova os Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 11 de Março de 1996, seção 1, 3977-3986.
3. Ferreira, C.L.L.F. Valor nutritivo e bioterapêutico de leites fermentados. **Leites Fermentados e Bebidas Lácteas Tecnologia e Mercado**, p.1-7, 1997.
4. Hoffman, F.L.; Cruz, C.H.G.; Vinturim, T.M. Qualidade microbiológica de queijos comercializados na região de São José do Rio Preto-SP. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, 50: 42-47, 1995.
5. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. V.1 Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, 533p.
6. Magalhães, N.A. *et al.* Avaliação físico química e microbiológica do leite pasteurizado integral/fazenda comercializado em viçosa. **Revista Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, 50: 3-8, 1995.
7. Oliveira, de C.A.F. *et al.* Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Hig. Aliment.**, 12: 31-35, 1998.
8. Ozola, L.; Ciprovica, I.; Serdjuka, N.; Rizikova, E. Low fat milk products with increased dietary fibre content. **Latvian University of Agriculture, Jelgava**, 31-33, 1998. In: AGRIS Abstr. CD-ROM, 1999. (Abstracts 026680).
9. Saboya, L.V. *et al.* Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijos Minas Frescal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 18:368-376, 1998.
10. Schmidt, K.F. **Elaboración artesanal de mantequilla, yogur y queso**. Editorial Acibio, S.A. – Zaragoza, 1990, 116p.
11. Tadini, C.C.; Curi, F.; Cardoso, A.M. Queso Minas Frescal con caseinato de calcio: una elaboracion alternativa de produccion de queso con menos grasa. **Alimentaria**, 35: 83-88, 1997.
12. Vargas, O.L.; Porto, M.A.C.; Brito, A.L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: municípios do Serro e de São Roque de Minas. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, 53: 19-49, 1998.

Recebido em 06/09/2000; Aprovado em 06/12/2001

Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás¹

Chemical composition of seeds and oil of baru (*Dipteryx alata* Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás, Brazil

Emy TAKEMOTO²
Isaura A. OKADA²
Maria Lima GARBELOTTI²
Mário TAVARES^{2*}
Sabria AUED-PIMENTEL²

RIALA6/901

Takemoto, E. *et al.* Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):113-117, 2001.

RESUMO. Um considerável número de espécies arbóreas constitui a flora brasileira, em alguns casos, seus frutos revelam-se boas fontes de nutrientes. Objetivando contribuir nessa área, foi determinada a composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.), nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. A metodologia analítica para a determinação da composição centesimal aproximada da semente e em ácidos graxos de seu óleo seguiu o descrito nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" (1985), o método enzimático-gravimétrico de Lee para as fibras totais, e a técnica da Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICP-AES) para os minerais. A semente de baru apresentou teores relativamente elevados de lipídios (38,2 g/100 g) e proteínas (23,9 g/100 g) e, conseqüentemente, de calorías (502 kcal/100 g), além de valores significativos de fibras alimentares (13,4 g/100 g) e de minerais, como potássio (827 mg/10 g), fósforo (358 mg/100 g) e magnésio (178 mg/100 g), sugerindo seu emprego na alimentação humana e animal, desde que não contenha substâncias tóxicas ou alergênicas. O óleo da semente revelou um elevado grau de insaturação (81,2%), conteúdo de α -tocoferol (5,0 mg/100 g) e composição em ácidos graxos semelhantes a do óleo de amendoim, destacando-se os ácidos oléicos (50,4%) e linoléico (28,0%), este considerado essencial, o que favorece seu uso para fins alimentícios e como matéria-prima para as indústrias farmacêutica e oleoquímica.

PALAVRAS-CHAVE. Baru, *Dipteryx alata* Vog., sementes, óleo, composição química.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um grande número de espécies florestais nativas, sendo que os frutos de algumas delas revelaram-se boas fontes de nutrientes, como por exemplo, a sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.)¹⁶.

Nos últimos anos tem crescido a pesquisa e a produção de frutas e sementes oleaginosas, tanto para a indústria oleoquímica como para a alimentícia, que absorvem a maioria dos óleos obtidos de fontes naturais⁶. Esses óleos poderiam suprir a deficiência da produção brasileira, como ocorre, por exemplo, no caso do óleo de girassol, cujo consumo domésti-

¹ Apresentado no XI Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Recife/PE, 2000.

^{2*} Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, C.P. 1783, 01059-970, São Paulo/SP.

co tem crescido cerca de 16% ao ano e a produção 5% em média⁷.

Apesar de já existirem estudos sobre a composição de sua polpa e semente^{15,17}, o baru (*Dipteryx alata* Vog.) mereceria ser mais pesquisado quanto à composição química de sua semente e de seu óleo, já que se prolifera na região do Planalto Central, precisamente no norte de Minas Gerais, Goiás e centro de Mato Grosso, indo até a costa atlântica do Maranhão¹¹.

A referida espécie pertence à família *Leguminosae* e é conhecida popularmente por baru, em Minas Gerais; barujo, coco-feijão e cumbaru, em Mato Grosso; cumarurana, emburena brava e pau cumaru, em outros Estados¹². É uma árvore alta, de caule reto, cujo fruto (Figura 1) é descrito como sendo uma drupa, com polpa rica em proteína, aromática, muito consumida pelo gado e animais silvestres¹⁰ e pelo homem, na forma de doces, como na região de Pirenópolis, Estado de Goiás, sob a denominação “pé-de-moleque”¹⁵; sua semente também é comestível, nutritiva e contém óleo com propriedades medicinais^{10,12,14}.

O presente trabalho caracterizou a semente e o óleo de baru, por meio da composição centesimal e de minerais da semente e da composição em ácidos graxos e de tocoferóis do seu óleo, visando a possível utilização de ambos, alternativamente, para fins alimentícios.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os frutos da *Dipteryx alata* Vog. foram colhidos maduros, do chão, no mês de novembro de 1999 em propriedades rurais localizadas no Município de Pirenópolis, Estado de Goiás.

As sementes (Figuras 1 e 2) foram retiradas manualmente dos frutos, com o auxílio de maquinário artesanal, acondicionadas em saco plástico selado, e enviadas de imediato para análise nos laboratórios dos Institutos Adolfo Lutz e Florestal, em São Paulo/SP.

Foram selecionadas para o estudo 100 sementes com peso médio de 1,29 g.

As sementes selecionadas foram trituradas e homogêneas em multiprocessador doméstico e analisadas.

Métodos

A composição centesimal aproximada das sementes, quanto à umidade, cinzas, lipídios e proteínas, foi determinada pelos seguintes métodos descritos nas “Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz”⁸: perda por dessecação; resíduo por incineração; extração direta com éter etílico em aparelho tipo Soxhlet; processo de digestão Kjeldahl, respectivamente. O teor de fibras alimentar foi efetuado pelo método enzimático-gravimétrico⁸, e os carboidratos totais, calculados por diferença.

O valor calórico total foi calculado, empregando-se os seguintes fatores: 4, para proteínas e carboidratos e 9 para lipídios⁵.

A composição em ácidos graxos do óleo extraído da semente (método de Soxhlet) foi determinada por cromatografia em fase gasosa, empregando um cromatógrafo a gás marca Shimadzu, modelo GC-17 A, com detector de ionização de chama. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram preparados de acordo com a técnica descrita nas normas acima referidas.

Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m, com diâmetro interno 0,25 cm e espessura do filme 0,20 µm. Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada da coluna: 80 a 220 °C (5 °C/min); temperatura do injetor: 230 °C; temperatura do detector: 240 °C; gás de arraste, hidrogênio, velocidade linear 40 mL/min; razão de divisão da amostra 1:50. Os ácidos graxos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção de padrões puros dos ésteres metílicos de ácidos graxos com os componentes separados das amostras. A identificação do ácido graxo C24:0 foi confirmada através da construção do gráfico do tempo de retenção pelo número de carbonos da série homóloga de ácidos graxos saturados, considerando que foi empregada programação linear de aumento de temperatura da coluna. A quantificação foi feita por normalização de área.

Os tocoferóis foram separados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, conforme



Figura 1. Frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.).

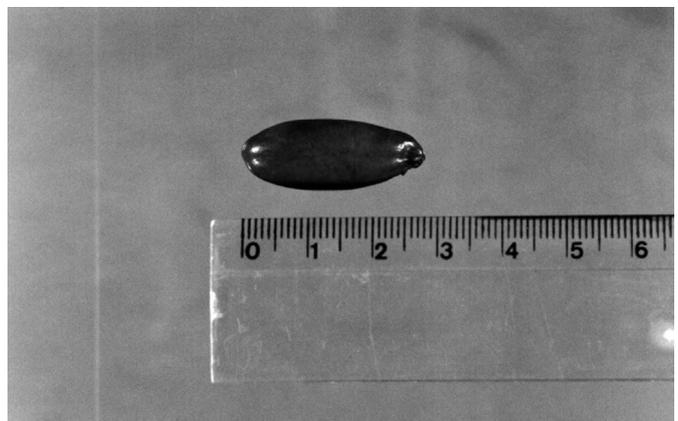


Figura 2. Sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.).

metodologia AOCS Ce 8-89¹. O óleo extraído das amostras foi dissolvido em n-hexano e submetido diretamente à análise por CLAE. Empregou-se um sistema de cromatografia líquida marca Shimadzu, composto de vários módulos: bomba LC-10AD; detector de fluorescência (RF-10AXL) com comprimentos de onda de excitação 290 nm e emissão 330 nm; módulo de comunicação CBM-10-AD e software Class LC10-AD para aquisição de dados e controle total do sistema.

Os componentes foram separados em coluna cromatográfica de aço inox empacotado com sílica com partículas de 5 µm, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. A fase móvel utilizada foi n-hexano/isopropanol (99,5:0,5 v/v) com fluxo de 1,2 mL/min. Os solventes empregados foram de grau HPLC. Os tocoferóis foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões puros analisados nas mesmas condições. Estes foram quantificados por padronização externa, sendo utilizados padrões de alfa, beta, gama e delta tocoferóis da marca Merck com as seguintes purezas: alfa-tocoferol: 99,2%; beta-tocoferol: 99,6%; gama-tocoferol: 102,1% e delta-tocoferol: 99,9%.

Para a determinação dos minerais (macro e micronutrientes), as amostras foram tratadas por via seca, segundo o método 985.01 da A.O.A.C.¹.

Os minerais (Ca, Cu, Fe, P, Mg, Mn, K, Zn) foram caracterizados e quantificados nas amostras solubilizadas pela técnica da Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICP-AES), operando à potência de 1,2 kW e à velocidade de introdução da amostra de 1,5 mL/min.

Todas as determinações foram realizadas com 5 repetições, exceto as de minerais, com 7 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal aproximada e valor calórico total (VCT) das sementes de baru.

Os componentes majoritários foram os lipídios (38,2%) e proteínas (23,9%). Comparando-se tais resultados com os verificados para sementes de baru colhidas no Estado de São Paulo e em Brasília, DF^{15,17}, observa-se que o teor de lipídios ora obtido (38,2%) foi ligeiramente inferior àqueles (41,65% e 40,3%, respectivamente), e o de proteínas foi semelhante à amostra paulista (23,45%) e esteve abaixo da brasiliense (29,6%).

Considerando os percentuais de lipídios e proteínas obtidos neste experimento, sugere-se uma avaliação das aludidas sementes em dietas, exceto se for relatada a presença de substâncias tóxicas ou alergênicas nas mesmas.

O teor de carboidratos totais encontrados (15,8%) foi maior do que a soma de glicose e sacarose (11,32%) referida para a amostra de São Paulo¹⁷ e mais do que o dobro da de Brasília (7,3%)¹⁵. No entanto, tal comparação fica prejudicada, visto que nestes trabalhos os açúcares foram determinados experimentalmente e no atual calculados por diferença.

Tabela 1. Composição centesimal aproximada (g/100 g) e valor calórico total (kcal/100 g) da semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.)^{*}.

Componentes	Valores Média ± DP
Substâncias voláteis a 105 °C (umidade)	6,1 ± 0,2
Resíduo mineral fixo (cinzas)	2,70 ± 0,06
Lipídios	38,2 ± 0,4
Proteínas (N x 6,25)	23,9 ± 0,6
Carboidratos totais**	15,8 ± 0,6
Fibras totais	13,4 ± 0,3
Fibras solúveis	2,5 ± 0,2
Fibras insolúveis	10,9 ± 0,3
Valor calórico total (VCT)***	502 ± 3

* Média de cinco repetições

** Calculado por diferença

*** Valor teórico

DP – desvio padrão

O conteúdo de fibras totais ou alimentares encontrado (14,39%) foi menor do que a de Brasília (19,04%), porém predominando as fibras insolúveis como na amostra brasiliense (11,64% e 14,1%, respectivamente)¹⁵. Tais comparações foram efetuadas com os resultados calculados na base seca. Cabe ressaltar que pesquisas recentes vêm demonstrando o papel fisiológico da fração chamada fibra alimentar, sendo assim importante à obtenção de dados quantitativos sobre a sua presença nos alimentos⁹.

Por sua vez, os conteúdos de cinzas foram aproximados nos três casos (2,70% a 2,85%) e o de umidade se assemelhou para as sementes deste trabalho e de São Paulo (6,1% e 5,80%, pela ordem)¹⁷, não constando essa informação para a da outra localidade.

O valor calórico total (VCT) teórico encontrado no presente estudo (502 kcal/100 g) foi menor do que o das amostras paulistas (561 kcal/100 g), principalmente em função dos valores de lipídios mais altos desta última¹⁷. Para as amostras brasilienses, não constava o VCT¹⁴.

No que se refere à composição em ácidos graxos (Tabela 2), o óleo da semente de baru deste estudo revelou-se altamente insaturado (81,2% p/p de metil ésteres), semelhante ao óleo da semente de São Paulo (80,87%)¹⁷.

O elevado grau de insaturação anteriormente abordado deveu-se à predominância dos ácidos oléico (50,4%) e linoléico (28,9%), este último considerado essencial. Os referidos valores se enquadram na faixa aplicada pelos padrões de identidade do Brasil e da American Oil Chemists' Society (AOCS) para o óleo de amendoim, sendo os seguintes: C18:1, Brasil, 35,0-72,0%; AOCS, 36,4-67,1%; C18:2, Brasil, 13,0-45,0%, AOCS, 14,0-43,0%^{1,3}.

A significativa quantidade de lipídios verificada na semente de baru, ao lado da composição em ácidos graxos de seu óleo, sugere a sua possível utilização na alimentação humana como óleo de amendoim, pouco produzido e consumido atual-

Tabela 2. Composição em ácidos graxos (% p/p de metilésteres) e em tocoferóis (mg/100 g) dos óleos da semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.)* e de amendoim (valores teóricos).

Ácidos graxos/tocoferóis	Valores experimentais		Valores teóricos	
	Óleo de semente de baru		Óleo de amendoim	
	Obtidos Média ± DP	Ref.17	Ref.3	Ref.1
C _{16:0} (palmítico)	7,6 ± 0,3	7,40	6,0-16,0	8,3-14,0
C _{18:0} (esteárico)	5,4 ± 0,3	3,12	1,3-6,5	1,0-4,4
C _{18:1} (oléico)	50,4 ± 0,6	50,17	35,0-72,0	36,4-67,1
C _{18:2} (linoléico)	28,0 ± 0,9	30,70	13,0-45,0	14,0-43,0
C _{20:0} (araquídico)	1,07 ± 0,03	0,82	1,0-3,0	1,1-1,7
C _{20:1} (gadoléico)	2,7 ± 0,1	–	0,5-2,1	0,7-1,7
C _{22:0} (behênico)	2,6 ± 0,1	2,12	1,0-5,0	2,1-4,4
C _{24:0} (lignocérico)	2,1 ± 0,3	–	0,5-3,0	1,1-2,2
N.I.	–	4,94	–	–
AGS	18,8	13,46	–	–
AGI	81,2	80,87	–	–
α-tocoferol	5,0 ± 0,2	–	–	4,9-37,3
γ-tocoferol	4,3 ± 0,7	–	–	8,8-38,9

* Média de cinco determinações

DP = desvio padrão

N.I. = não identificados

AGS = ácidos graxos saturados

AGI = ácidos graxos insaturados

mente em nosso país, ou como matéria-prima na indústria farmacêutica ou oleoquímica. Entretanto, um fator limitante seria a dificuldade de se adaptar instalações industriais para extração de óleo de uma matéria-prima regional.

A tabela 2 mostra ainda os valores de alfa e gama-tocoferol para o óleo de semente de baru dados pela técnica CLAE. No tocante ao α-tocoferol, o valor encontrado (5,00 mg/100 g) se acha próximo do limite mínimo referido pela AOCS (4,9-37,3 mg/100 g) para o óleo de amendoim, estando o γ-tocoferol (4,3 mg/100 g) abaixo (8,8-38,9 mg/100 g)¹.

Os teores de minerais (macro e micronutrientes) da semente de baru são apresentados na Tabela 3.

Com relação aos macronutrientes, foram encontrados quatro (Ca, Mg, P, K) dos seis considerados essenciais⁴, a exemplo do constatado para semente de baru de São Paulo¹⁷. O potássio exibiu a maior concentração (827 mg/100 g), seguido do fósforo (358 mg/100 g), sendo que este último desempenha também importante papel no processo germinativo da semente¹³.

Por sua vez, quatro micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Zn) dentre os oito essenciais³ foram verificados tanto na semente presentemente estudada como na paulista¹⁶, destacando-se o manganês (4,9 mg/100g) que, junto com o ferro e o zinco, desempenha importante papel no metabolismo humano⁴.

CONCLUSÕES

Pelos resultados encontrados pode-se concluir que:

As sementes de *Dipteryx alata* Vog. (baru) constituem uma fonte significativa de lipídios, proteínas e, conseqüentemente, de calorías, além de fibras alimentares e minerais, sugerindo sua utilização na alimentação humana e animal, desde que

Tabela 3. Teores de minerais (mg/100 g) da semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.)*.

Elementos	Valores
Cálcio (em Ca)	140 ± 4
Cobre (em Cu)	1,45 ± 0,06
Ferro (em Fe)	4,24 ± 0,08
Fósforo (em P)	358 ± 6
Magnésio (em Mg)	178 ± 3
Manganês (em Mn)	4,9 ± 0,3
Potássio (em K)	827 ± 46
Zinco (em Zn)	4,1 ± 0,1

* Média de sete determinações

comprovada a inexistência de compostos tóxicos ou alergênicos nas mesmas.

As sementes estudadas são também boas fontes de macro e micronutrientes essenciais, como potássio, fósforo e manganês.

O óleo da semente de baru apresenta teor de α-tocoferol e composição em ácidos graxos semelhantes aos do óleo de amendoim, destacando-se os ácidos oléico e linoléico, este considerado essencial.

O elevado grau de insaturação do óleo da semente de baru favorece seu uso para fins comestíveis ou como matéria-prima para as indústrias farmacêutica e oleoquímica, se eliminadas eventuais substâncias nocivas à saúde.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Srs. Ivan Pedro J. Schiffer e Catarina J. Schiffer pelo fornecimento de amostras para a ex-

cação do presente trabalho, ao Sr. Antonio Roberto de Souza Ferreira pelos serviços de fotografia e à Pesquisadora Maria Isabel Vallilo, do Instituto Florestal de São Paulo, pelas sugestões apresentadas.

RIALA6/901

Takemoto, E. *et al.* Chemical composition of seeds and oil of baru (*Dipteryx alata* Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):113-117, 2001.

ABSTRACT. A considerable number of the arboreous species composes the Brazilian's forests, but some of the fruits have shown to be good sources of nutrients. In this paper, the chemical composition of seeds, the fatty acid profile of the oil and the inorganic elements contained in the baru (*Dipteryx alata* Vog.), fruits from the region of Pirenópolis, state of the Goiás, Brazil, were determined. The chemical analytical methodology followed the "Analytical Methods of the Adolfo Lutz Institute", 1985; the minerals and dietary fiber was determined by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) technique and enzymatic-gravimeter method, modified by Lee *et al.*, respectively. The sample showed a high level of the lipid (38,2 g/100 g) and proteins (23,9 g/100 g) and consequently values significative of calories (502 kcal/100 g), dietary fiber (13,4 g/100 g) and minerals (K, 827 mg/100 g; P, 358 mg/100 g; Mg, 178 mg/100 g). These results favour the use of the seeds for human and animals consumption, since that they don't contain toxics and allergenic substances. The oil showed a high level of unsaturation (81,2%) nevertheless the fatty acids profile and the content of the a-tocopherol (5,00 mg/100 g), assimilate at the peanut oil, emphasizing that the oleic (50,4%) and linoleic (28,0%) acids, fatty acid essentials, reforce the use this oil as a source of raw material for the pharmaceutical and oleochemical industries.

KEY-WORDS. Baru, *Dipteryx alata* Vog., seeds, oil, chemical composition.

REFERÊNCIAS

1. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, A.O.C.S., 1996. (Sections C, p. 1-5; I, p. 37).
2. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1995 (method 985.01).
3. Brasil. Leis, decretos, etc. Resolução Nº 482, de 23 de setembro de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico referente a Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial**, Brasília, 13 out. 1999, Seção I, p. 82-87 (Anexo 3 – Óleo de amendoim).
4. De Angelis, R.C. **Fisiologia da nutrição – fundamentos para nutrição e para desnutrição**. São Paulo, EDART, 1977. v. 1, p.320.
5. Ferreira, F.A.G.; Graça, M.E. da S. **Tabela da composição dos alimentos portugueses**. Lisboa, Instituto Superior de Higiene Dr. Ricardo Jorge, 2^a ed., 1983. p.7.
6. Freire, R.M.M.; dos Santos, R.C.; Beltrão, N.E. de M. Qualidade nutricional e industrial de algumas oleaginosas herbáceas cultivadas no Brasil. **Óleos & Grãos**, 5(28):49-53, 1996.
7. Freitas, S.M. de Girassol, um mercado em expansão. **Óleos & Grãos**, 10(55):30-34, 2000.
8. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, IMESP, 3^a ed., 1985. p. 533, v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.
9. Lee, S.C.; Prosky, L.; Devries, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MÉS-TRI Buffer: colaborative study. **JAOAC Int.**, 75:395-416, 1992.
10. Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Plantarum, Nova Odessa, 1992. p. 202.
11. Melheim, T.A. **Fisiologia do desenvolvimento de *Dipteryx alata* Vog. – Contribuição ao seu estudo**. São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1972, 215 p. [Tese de Doutorado].
12. Pio Corrêa, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, 1984. 707 p. v. 2.
13. Popinigis, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, Agiplan, 2^a ed., 1985. 289 p.
14. Rizzini, C.T.; Wors, W.B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo, EPUSP, 1976. 207 p.
15. Togashi, M.; Sgarbieri, V. C. Avaliação nutricional e da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 15(1):66-69, jan.-jun. 1995.
16. Vallilo, M.I. *et al.* ***Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals**. **Food Chem.**, 66:197-200, 1999.
17. Vallilo, M.I.; Tavares, M.; Aued, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) – caracterização do óleo da semente. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, 2(2): 115-125, 1990.

Recebido em 08/12/2000; Aprovado em 06/12/2001

Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas no município de São Vicente

Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to drugs in São Vicente municipality

Priscila C.R. JARDIM¹
Liliana A. ZAMARIOLI¹
Andréa G.V. COELHO^{1*}
Teresa R. FIGUEIREDO¹
Mauro A. ROZMAN²

RIALA6/902

Jardim, P.C.R. *et al.* Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas no município de São Vicente. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):119-123, 2001.

RESUMO. Esse estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas. No período de abril/1998 a março/1999, os espécimes clínicos de 235 pacientes sintomáticos respiratórios ou com diagnóstico de tuberculose pulmonar, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde no município de São Vicente, foram submetidos à baciloscopia, cultura, identificação e teste de sensibilidade. Obtivemos 101 (45,70%) amostras positivas no exame de cultura. Destes, 87(86,14%) são pertencentes ao complexo MTb dos quais, 11 (12,6%) apresentaram uma “sugestiva” resistência adquirida, em razão de estarem em retratamento devido a abandono prévio. Com essa análise os autores sugerem, no município em questão, mudanças nos critérios de solicitação de exame no diagnóstico da tuberculose, com introdução da cultura e teste de sensibilidade a todos os pacientes suspeitos ou com diagnóstico de tuberculose pulmonar. Essas monitoração contínua possibilitará, ações da vigilância para controle dos casos de abandono de tratamento, da resistência às drogas e do avanço da tuberculose multirresistente, contribuindo, destarte, para o aumento na efetividade do tratamento e melhoria na qualidade do diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVES. micobactéria, quimioterapia, resistência às drogas.

INTRODUÇÃO

Diversamente do que se imaginou nas décadas de 60 e 70, nem mesmo a conquista de uma quimioterapia potente desencadeou um efetivo controle da tuberculose. A ampliação da miséria das populações desfavorecidas, bem como a relação da doença com a pandemia do HIV facilitaram o recrudesci-

mento da tuberculose em todo o mundo, contribuindo também para isso a diminuição dos investimentos no setor da saúde, a deterioração dos serviços de assistência pública e a resistência aos atuais quimioterápicos⁸.

Os autores norte-americanos referem-se a três epidemias intimamente relacionadas²². A primeira é ocasionada pela infecção HIV/SIDA, a segunda se relaciona com o ressurgimento da

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Santos.

² Vigilância Epidemiológica do município de São Vicente.

^{1*} Endereço para correspondência: R. Ministro João Mendes, 222/23 – Embaré – CEP 11040-060 – Santos/SP.

tuberculose que provocou uma inversão na curva de incidência descendente da enfermidade, e a terceira é a tuberculose por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes às drogas.

A resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos medicamentos relaciona-se a mutações genéticas das populações bacilares, variando normalmente de acordo com a droga^{11,27}. Quanto mais drogas forem usadas de forma inadequada, mais resistências irão aparecendo; ao selecionar cepas resistentes a mais de uma droga, teremos a multiresistência, no Brasil estabelecida, basicamente, quando ocorre falência aos esquemas I e III (conduta operacional) e, ou resistência a pelo menos três das mais importantes drogas usuais, rifampicina, isoniazida e estreptomicina, etambutol e/ou pirazinamida^{1,3,9,10,18,27}.

Os tratamentos irregulares, interrompidos antes de uma completa esterilização dos germes (abandono) ou feitos com doses inadequadas, condicionam o aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos, constituindo a chamada “resistência adquirida”. Bacilos resistentes assim selecionados, podem ser transmitidos para outros indivíduos que, mesmo sem qualquer tratamento prévio, já apresentarão cepas resistentes, ou seja, a “resistência primária”^{6,21,24,26}.

Estudos mostram, que no Brasil, a resistência às drogas e a multiresistência em sua maioria é “adquirida”, em consequência de falhas no tratamento, tais como a irregularidade, o abandono e prescrições inadequadas. Devem ser consideradas, ainda, a troca de drogas por efeitos adversos, mudanças precipitadas nos esquemas em alguns momentos, a não disponibilidade dos medicamentos para fornecimento, como admite o próprio Ministério da Saúde (MS)^{2,5}.

Ao elaborar este estudo tivemos como objetivo avaliar a resistência bacilar do *Mycobacterium tuberculosis*, neste município, incrementando o diagnóstico laboratorial, para todos os pacientes sintomáticos respiratórios ou com diagnóstico de tuberculose pulmonar, com a realização da cultura e teste de sensibilidade às drogas, evidenciando através de metodologia clássica a importância da implantação de técnicas de diagnóstico mais precisas da tuberculose, a fim de contribuir com a detecção de casos da doença e divulgar a situação epidemiológica da tuberculose resistente às drogas na região em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com a análise bacteriológica dos espécimes clínicos de 235 pacientes sintomáticos respiratórios ou com diagnóstico de tuberculose pulmonar, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde, deste município, no período de abril/1998 a março/1999.

As amostras de escarro, dos 235 pacientes, foram colhidas segundo as normas recomendadas pelo manual de Bacteriologia da Tuberculose do MS¹⁹.

Procedimentos Bacteriológicos

Baciloscopia – foi realizado um esfregaço de cada espécime clínico e corado pelo Método de Ziehl-Neelsen. No caso

de lâmina positiva efetuou-se a contagem bacilar semi-quantitativa conforme o índice baciloscópico recomendado pelo MS¹⁹.

Cultura – foi colocado aproximadamente 2 ml do espécime clínico em um tubo de polipropileno de fundo cônico e foi submetido a descontaminação pelo Método de Petroff²³ e semeado em dois tubos contendo Meio de Löwestein-Jensen¹⁹.

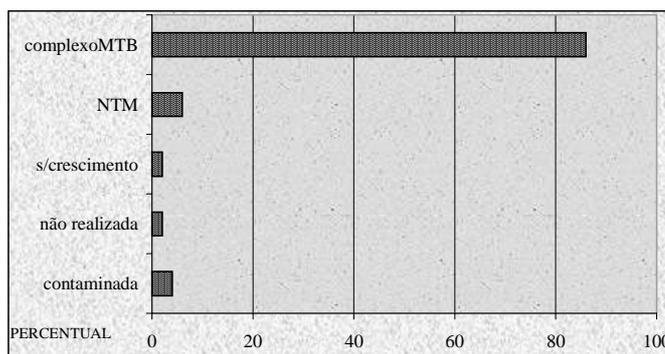
Os tubos foram incubados a 37 °C. Não havendo crescimento após 60 dias, as culturas foram consideradas negativas. As culturas positivas foram identificadas de acordo com as técnicas preconizadas pelo MS; observando-se a pigmentação das colônias, aspecto e realização de provas bioquímicas^{15,17,19,20}.

As cepas identificadas como *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central que realizou o teste de sensibilidade às drogas pelo Método da Razão de Resistência, padronizado pela Organização Mundial da Saúde⁴.

RESULTADOS

Das 235 amostras de escarro, de pacientes sintomáticos respiratórios ou com diagnóstico de tuberculose pulmonar, 14 (5,96%) apresentaram contaminação no exame de cultura. Com isso foram selecionadas 221 amostras, destas 101 (45,70%) apresentaram-se positivas no exame de cultura. Após o Teste de Identificação, as cepas pertencentes ao complexo MTb, foram submetidas ao Teste de Sensibilidade às drogas usuais do tratamento, conforme Figura 1 e 2, respectivamente.

No universo de 87 (86,14%) cepas do complexo MTb, 16 (18%) demonstraram resistência a pelo menos uma das 5 drogas estudadas (isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol e pirazinamida). Dentre as resistentes, 5 cepas foram excluídas, de acordo com as seguintes características do



NTM – do inglês “non tuberculous mycobacteria”.

Fonte: IAL/Santos.

Figura 1. Resultado do Teste de Identificação das 101 amostras com culturas positivas.

paciente: 1 por óbito e 4 por apresentar sorologia positiva para o HIV, devido à maior facilidade desses pacientes em adquirir infecções por germes resistentes⁷.

Obtivemos assim a Resistência dessas 11 (12,06%) cepas selecionadas para cada uma das 5 drogas, sendo: 1 (9,10%) INH-RMP-PZA-EM), 4 (36,40%) INH-RMP-PZA, 2 (18,20%) INH-RMP, 2 (18,20%) SM e 2 (18,20%) INH.

A Taxa de Resistência Global, que entende-se como, a taxa encontrada isolada mais as taxas de resistência para a mesma droga nas associações medicamentosas, está apresentada na Figura 3.

É importante ressaltar, que as cepas resistentes a pelo menos uma das cinco drogas estudadas, são pertencentes a pacientes em tratamento e com resposta medicamentosa desfavorável.

DISCUSSÃO

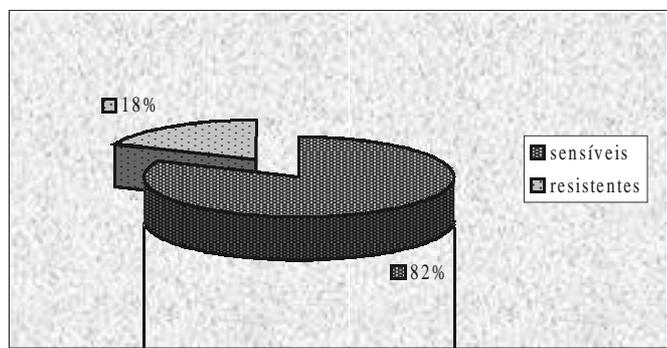
A meta proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é de curar, pelo menos, 85% dos casos bacilíferos que iniciam terapia antituberculose em todo o mundo. Isso determinará uma diminuição imediata, tanto da prevalência como da transmissão da Tuberculose²⁸.

O aumento progressivo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, multirresistentes agrava a situação sanitária, porque compromete seriamente a vida do enfermo¹⁶. Diversos estudos realizados demonstram que todo paciente que apresenta antecedentes de ter recebido tratamento antituberculose, é possível que abrigue germes resistentes a uma ou mais drogas^{12,13}.

Em nossos resultados encontramos 11 (12,6%) pacientes sugestivos de resistência adquirida, conforme o histórico epidemiológico dos mesmos, observamos casos de abandono, recidiva e falência ao tratamento. Destes, 7 (8,04%) são considerados multirresistentes, isto é, resistência a pelo menos três das mais importantes drogas usuais.

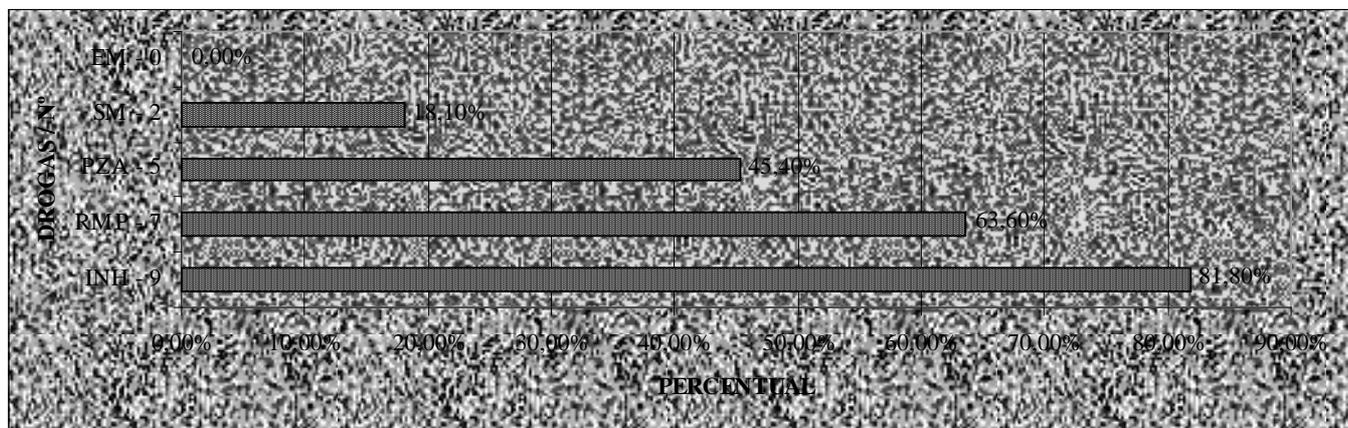
As taxas de resistências globais da isoniazida (81,8%) e da rifampicina (63,6%), são expressivas, desestruturam o esquema terapêutico utilizado, trazendo inconvenientes no tratamento da tuberculose, como a longa duração, efeitos colaterais das drogas alternativas, abandono de tratamento e o risco da transmissão de bacilos resistentes viáveis, podendo causar infecção tuberculosa por bacilos resistentes²⁵.

Como qualquer tratamento farmacológico prolongado, a adesão do paciente ao tratamento é fundamental. O risco de “adquirir” a resistência bacteriana, a uma ou mais drogas (resistência adquirida) e consequentemente o fracasso no tratamento, aumenta com tratamentos não controlados, os auto-administrados. Por isso, a melhor estratégia, de acordo com a OMS e a experiência de muitos países, consiste em aplicar o tratamento antituberculose diretamente observado (DOT, Directly Observed Treatment)^{14,28,29}.



Fonte: IAL/Santos.

Figura 2. Resultado do Teste de Sensibilidade, das 87 cepas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*.



INH-isoniazida/RMP-rifampicina/EM-etambutol/SM-estreptomicina/PZA-pirazinamida.

Fonte: IAL/Santos.

Figura 3. Distribuição da taxa de resistência global às drogas das 11 cepas resistentes.

No Estado de São Paulo o diagnóstico laboratorial da resistência é hoje preconizado apenas quando não se tem uma resposta clínica ao tratamento, quando se trata de paciente com sorologia positiva para HIV ou quando anteceder da alta por cura.

Portanto, pela análise da situação encontrada, observamos a necessidade de fortalecer o tratamento da tuberculose através das seguintes ações:

- diagnóstico precoce da enfermidade, que conduza a um tratamento rápido e eficaz, com a incrementação do diagnóstico laboratorial por meio da realização da cultura e teste

de sensibilidade para todos os pacientes sintomáticos respiratórios ou com diagnóstico de tuberculose pulmonar;

- fortalecimento do tratamento supervisionado, pois no Brasil os regimes recomendados eram somente ambulatoriais e auto-administrado.

Essa monitoração contínua possibilitará ações da vigilância para o controle dos casos de abandono de tratamento, da resistência às drogas e do avanço da tuberculose multirresistente, além da quebra da cadeia de transmissão da doença, contribuindo, destarte, para aumento na efetividade do tratamento e melhoria na qualidade do diagnóstico.

RIALA6/902

Jardim, P.C.R. *et al.* Resistant of *Mycobacterium tuberculosis* to drugs in São Vicente municipality. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):119-123, 2001.

ABSTRACT. The purpose of this study was to evaluate the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to drugs. During the period of April/1998 to March/1999, clinical specimens from 235 respiratory symptomatic patients or pulmonary tuberculosis diagnosed who were attended at the Basic Health Units of São Vicente municipality were submitted to smear microscopy, culture, identification and susceptibility test. We found 101 (45,70%) positive samples in the culture exams. Among these, 87 (86,14%) belonged to the MTb complex with 11 (12,6%) showing a “suggestive” acquired resistance due to a previous treatment abandon. According to this analysis, the authors suggest, in the mentioned municipality, changes related to the criteria for tuberculosis diagnostic examination request, such as the introduction of culture and susceptibility test to every tuberculosis suspected patients or pulmonary tuberculosis diagnosed. This continuous monitoring procedure might allow actions of vigilance control of treatment abandon cases, drug resistance and the spread of multiresistant tuberculosis, contributing to a betterment of treatment effectiveness and improvement in the diagnosis quality.

KEY WORDS. mycobacteria, chemotherapy, drug resistance.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da Saúde/FNG/CENEPI/CNPS/Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Uma proposta de classificação e condutas para casos de tuberculose no Brasil.** Recomendações da reunião Técnica, junho/1992. *J. Pneumologia*, 19:1-3, 1993.
2. Brasil, Ministério da Saúde/FUNASA/PNCT. **Documento básico da reunião de Avaliação Operacional e Epidemiológica do PNCT na década de 80.** *Bol. Pneumol. Sanit.*, n. Especial: 9-87, 1992.
3. Brasil, Ministério da Saúde/FUNASA/PNCT. **Manual de Normas para o Controle da Tuberculose**, 4a. ed..Brasília, 1995.
4. Collins, C.H.; Grange, J.M.; Yates, M.D. **Tuberculosis Bacteriology – Organization and Practice**, 2nd ed.. Oxford Butterworth – Heinemann, 1997.
5. Fiuza de Melo, F.M.; Afiune, J.B. **Drogas antituberculosas no Brasil: multiresistência.** *Avs Curandi*, 25:51-58, 1992.
6. Fiuza de Melo, F.M.; Afiune, J.B. **Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos.** *J.Pneumologia*, 19:42-49, 1993.
7. Fiuza de Melo, F.M. *et al.*, **Resistência Primária do “Mycobacterium tuberculosis” num serviço ambulatorial de referência em São Paulo: evolução por três décadas e comparação com outros estudos nacionais.** *J. Pneumologia* 22(1), 1996.
8. Fiuza de Melo, F.M. **Tuberculose: um assunto atual e oportuno.** *J. Pneumologia*, 19:III,1993.
9. Fiuza de Melo, F.M.; Ide Neto, J.; Seiscento, M. *et al.* **Tuberculose multirresistente.** *J. Pneumol.* 19:73-82, 1993.
10. Fiuza de Melo, F.M.; Ide Neto, J.; Seiscento, M. *et al.* **Tuberculose multirresistente no Brasil, uma definição operacional ou bacteriológica?** *J. Pneumol.* 22, 1996.
11. Fox, W.; Witchison, D.A. **Quimioterapia de la tuberculosis.** *OPAS/OMS, Publ.Cient.* 310,1975.
12. Iseman, M.D. **Treatment of multidrug-resistant tuberculosis.** *N. Engl. J. Med.*,784-91, 1993.
13. Jarad, N.A.; Parastatides, S.; Paul, E.A.; Sheldon, D.C.;Gaya, H.; Rudd, R.M.; *et al.*. **Characteristics of patients with drug resistant and drug sensitive tuberculosis in east London between 1984 and 1992.** *Thorax*, 49: 808-810, 1994.
14. Kantor, I.N.; Latini, O.; Barrera, L. **La Resistencia y Multirresistencia a los Medicamentos Antituberculosos en la Argentina y en Otros Países de America Latina.** *Medicina (Buenos Aires)*, 58:202-208, 1998.
15. Kent, P.T.; Kubica, G.P. **Identification test techniques.**In: **Public Health Mycobacteriology. A guide for the Level III Laboratory.** Centers for Disease Control, Atlanta, p. 207, 1985.

16. Larrosa, J.R.; Corradi, H.; Braselli, A. **Primeros casos de tuberculosis multirresistentes en SIDA.** Uruguay. Arch. Med., XIX; 2:67-70, 1997.
17. Levy, U. *et al.* **A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnoses of pulmonary tuberculosis.** Chest. 95:1193-1197, 1989.
18. Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária e Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **I Consenso Brasileiro de Tuberculose.** J. Pneumologia, 23(6), 1997.
19. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Combate da Tuberculose. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 1ª ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional da Saúde, 1998.
20. Mitchison, D.A. **Bacteriology of tuberculosis.** Trop. Doct., 4:141-3, 1974.
21. Mitchison, D.A. **The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy.** Tubercle, 66:219-225, 1985.
22. Neville, K.; Bromberg, A.; Bromberg, R.; Bonk, S.; Hanna, B.A.; Rom, W.N. **The third epidemic-multidrug-resistant tuberculosis.** Chest.,105:45-48, 1994.
23. Petroff, S.A. **A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from sputum and feces.** J. Exp. Med., 21:38, 1915.
24. Rosemberg, J. **Quimioterapia da tuberculose: I – Princípios fundamentais. II – Medicamentos. Tipos de tratamento. Avaliação e controle.** Rev. Ass. Med. Brasil, 29:90-101, 1983.
25. Silva, E.A.M.; Sato, D.N.; Telles, M.A.S.; Martins, M.C.; Palaci, M.; Ueki, S.Y.M. **Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, 52(1/2):37-40, 1992.
26. Toman, K. Tuberculosis case-finding and chemotherapy. **Questions and Answers.** WHO, 1979.
27. Vareldezis, B.P.; Grosset, J.; Kantor, I.; Crofton, J.; Laszlo, A.; Felten, M.; Raviglione, M.C.; Kochi, A. **Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues.** Tubercle Lung Dis,75:1-7, 1994.
28. WHO Global Tuberculosis Programme. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. **The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug resistance Surveillance 1994-1997. WHO/TB/97.229.** WHO, Geneva, 1997.
29. WHO. **Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes.** WHO/TB/97.220. Seconde Edition, WHO, Geneva, 1997.

Recebido em 27/06/2001; Aprovado em 07/02/2002

Ovo desidratado para substituir ovo “in natura” na preparação do meio Löwenstein-Jensen para cultivo de micobactérias

Dehydrated egg to replace “in natura” egg in the preparation of Löwenstein-Jensen medium for mycobacteria culture

Heloísa da S.P. PEDRO¹
Maria Izabel F. PEREIRA¹
Maria do Rosário A. GOLONI¹
Elidia Q. GUIMARÃES¹
Maria Alice da S. TELLES²

RIALA6/903

Pedro, H.S.P. *et al.* Ovo desidratado para substituir ovo “in natura” na preparação do meio Löwenstein-Jensen para cultivo de micobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):125-128, 2001.

RESUMO. Os métodos bacteriológicos são extremamente importantes para diagnosticar tuberculose pulmonar. O meio de cultura mais comumente usado para isolar micobactérias é o Löwenstein-Jensen (LJ), meio sólido à base de ovos. Os ovos precisam sofrer uma limpeza prévia que consiste em escová-los com água e sabão, com posterior descontaminação por 30 minutos em álcool 70%. O ovo “in natura” apresenta dois inconvenientes: esta limpeza, que é demorada e o sistema de compras e armazenamento, pois os ovos devem ser frescos. Com o propósito de simplificar este procedimento, este estudo comparou o meio preparado com ovos frescos e com ovos desidratados. Amostras clínicas foram processadas para cultura e o inóculo foi semeado nos dois tipos de meios. Os resultados das culturas mostraram que das 150 amostras positivas pela baciloscopia, 123 foram positivas no meio convencional e 24 foram negativas, enquanto que no meio teste, foram 121 positivas e 26 negativas, mostrando uma diferença que não foi significativa. Contaminações ocorreram igualmente nos dois meios (3 amostras). Ao comparar-se os dois meios a sensibilidade foi de 98% e a especificidade de 100%. Conclui-se que o ovo desidratado pode ser uma forma alternativa e vantajosa, no preparo do meio de Löwenstein-Jensen.

PALAVRAS-CHAVE. meio de cultura, Löwenstein-Jensen, tuberculose, ovo desidratado.

INTRODUÇÃO

Em 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose uma emergência mundial devido ao fato de ser uma doença em crescimento progressivo em todo mundo e fora de controle nas áreas mais pobres do planeta¹.

O método bacteriológico é o mais importante recurso para o diagnóstico e controle de tratamento da tuberculose, pois permite a detecção do agente etiológico por meio de baciloscopia e cultura.

A baciloscopia é um teste presuntivo, pois possibilita a visualização de bacilos álcool-ácido resistentes quando pre-

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

² Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

sententes em quantidades superiores a 10.000 bacilos/mL de amostra, mas não permite sua identificação.

A cultura é um método mais sensível, pois detecta de 10 a 100 bacilos/mL de amostra e possibilita a identificação das espécies e a realização do teste de sensibilidade às drogas antituberculose.

No caso da tuberculose extrapulmonar somente a cultura fornece a confirmação diagnóstica.

Apesar de todo investimento em novos métodos diagnósticos e o avanço alcançado, nestes últimos anos, em metodologias que tragam mais agilidade ao diagnóstico da tuberculose, a cultura continua seguindo como método sem substituto.

As modernas metodologias baseadas em biologia molecular são complexas e de alto custo, inviabilizando sua utilização de forma universalizada^{2,3,4,5,6}.

Uma alternativa é, portanto, o aperfeiçoamento das técnicas já existentes.

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de micobactérias é o Löwenstein-Jensen, que é um meio solidificado à base de ovo e contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio. Este meio permite o crescimento da quase totalidade das espécies micobacterianas, tanto ambientais como as de interesse médico⁷.

Com o objetivo de aperfeiçoar e facilitar a técnica de preparo do meio de cultura Löwenstein-Jensen, foi feita uma tentativa de substituir o ovo "in natura" por ovo desidratado utilizado em confeitarias.

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da cultura para diagnóstico de tuberculose, utilizando meio de Löwenstein-Jensen preparado com ovos frescos e com ovos desidratados, através do procedimento tipo secador contínuo com atomização com Spray Driers⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 150 amostras de escarro e materiais extrapulmonares com baciloscopias positivas e 50 amostras com baciloscopias negativas, recebidos na rotina de cultura do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de São José do Rio Preto/SP, no período de 10 de março a 30 de outubro de 2000. Das 150 amostras com baciloscopia positiva, 147 eram escarro e 3 amostras de origem extrapulmonar; das 50 amostras com baciloscopia negativa, 46 eram escarro e 4 amostras de origem extrapulmonar. O método de descontaminação utilizado foi o de Petroff modificado⁷; de cada amostra, após descontaminação, foi semeado 0,2 mL em 2 tubos de Löwenstein-Jensen (LJ), sendo um convencional e um teste. Os tubos foram incubados a 37 °C, observados e comparados semanalmente, até completar 60 dias de incubação.

Os ovos frescos necessários para a preparação do meio convencional foram adquiridos em supermercados da região; para a utilização dos ovos frescos no preparo do meio de cultura, faz-se necessária uma limpeza prévia dos mesmos

com auxílio de escova, água e sabão, enxaguie em água corrente e imersão em álcool etílico a 70%, durante 30 minutos. O ovo desidratado para a preparação do meio teste foi adquirido em confeitarias da região. O ovo desidratado se apresenta na forma de um pó fino amarelado, e é recomendado o armazenamento em temperatura ambiente por até 180 dias.

Para a obtenção de ovo desidratado que equivalha a 20 ovos grandes necessários na preparação do meio de Löwenstein-Jensen, foi pesado o pó e colocado em copo estéril de liquidificador. Em seguida, batido no liquidificador com a quantidade necessária de água destilada estéril, até completa homogeneização. De acordo com o fabricante, 12,5 g de ovo desidratado equivale aproximadamente a um ovo tipo grande. Portanto para a obtenção de uma solução equivalente a 20 ovos, pesou-se 250 gramas de ovo desidratado em 750 mL de água destilada estéril. Após a homogeneização essa solução de ovos foi filtrada em gaze estéril. Adicionou-se o homogeneizado ao meio base, manipulado segundo a metodologia padronizada⁷. Acrescentou-se uma solução de 2% de verde malaquita que é inibidor de flora contaminante. Distribuiu-se 7 mL deste meio em tubos com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. Coagulou-se a 85 °C por 50 minutos. Os meios de cultura prontos para uso, são estocados em geladeira a 4 °C.

Cada partida do meio de cultura preparado foi avaliada quanto à esterilidade incubando-se a 37 °C por 24 horas, e quanto à sensibilidade no isolamento de micobactérias, de acordo com técnica padronizada pelo Manual de Bacteriologia da Tuberculose⁷. A partir de um cultivo recente (20 a 30 dias de crescimento) de *M. tuberculosis* em meio solidificado, fez-se uma suspensão em 1,0 mL de água destilada estéril, com pérolas de vidro em frasco estéril. Esta suspensão foi transferida para um tubo, acrescentando-se água destilada até obter turvação comparável ao tubo n°1 da Escala McFarland⁹. A partir desta suspensão padronizada, efetuaram-se diluições decimais de até 10⁻⁶. Foi semeado 0,2 mL de cada diluição de *M. tuberculosis* em tubos de Löwenstein-Jensen convencional e em tubos de Löwenstein-Jensen teste¹⁰.

RESULTADOS

Das 50 amostras com baciloscopias negativas, uma deu cultura positiva em ambos os meios. As restantes 49 amostras deram cultura negativa no meio LJ convencional. No meio LJ teste, duas amostras contaminaram e, portanto foram 47 com resultados negativos. Das 150 amostras com baciloscopias positivas, 123 culturas foram positivas no meio LJ convencional e 121 positivas no LJ teste; 24 culturas foram negativas no meio LJ convencional e 26 negativas para o meio LJ teste; 3 culturas mostraram-se contaminadas em ambos os meios, como demonstrado na Tabela 1.

A ocorrência de amostras que tiveram resultados de baciloscopia positiva e culturas negativas (24 no LJ convencional e 26 no LJ teste), deve-se, provavelmente, ao fato de se-

Tabela 1. Resultado da cultura utilizando meio Löwenstein-Jensen e Löwenstein-Jensen teste com ovo desidratado.

Amostras	Meios de cultura					
	L.J. convencional			L.J. teste		
	Pos	Neg	Cont	Pos	Neg	Cont
Baciloscopia Negativa	1	49	0	1	47	2
Baciloscopia Positiva	123	24	3	121	26	3

L.J. – meio de Löwenstein-Jensen

rem amostras provenientes de pacientes em tratamento e cujas baciloscopias apresentavam raros bacilos.

Não houve diferença dos resultados das culturas em relação ao tipo de amostra, pulmonar ou extrapulmonar.

O teste de esterilidade, realizado após 24 horas, não mostrou a presença de contaminação nos meios de cultura convencional e teste.

O controle de qualidade dos meios de cultura, tanto do convencional como do teste, mostraram índice de detecção adequado, pois houve crescimento de 20 colônias ou mais na diluição 10^{-6} em todas as partidas de meio preparadas.

Das culturas positivas 7 tinham aspecto de micobactérias não-tuberculose (MNT); 6 foram identificadas como complexo *Mycobacterium avium* e 1 provavelmente ambiental, pois a identificação não chegou a uma espécie de tipo potencialmente patogênica.

A Tabela 2 mostra os resultados das culturas obtidas em meio LJ convencional e em meio LJ teste.

DISCUSSÃO

A preparação dos meios à base de ovos requer uma limpeza prévia para desinfecção. O uso do ovo desidratado permite a eliminação desta etapa que é bastante trabalhosa. Possibilita ainda, maior flexibilidade na programação de compras e uso do produto, uma vez que o mesmo tem vida útil de 180 dias enquanto o ovo fresco deve ser utilizado em 15 dias. Além disso, permite a estocagem sem necessidade de refrigeração, o ambiente mais limpo e manuseio mais rápido, uniformidade dos produtos, redução de custos e perdas, e a simplificação e diminuição do tempo na preparação do meio.

Tabela 2. Avaliação da acurácia do meio Löwenstein-Jensen teste no isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de amostras de escarro e de amostras de material extrapulmonar.

Crescimento em L.J. teste	Crescimento em L.J. tradicional		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	122	0	122
Negativo	2	73	75
Total	124	73	197

L.J. – meio de Löwenstein-Jensen

Sensibilidade = $122/124 \times 100 = 98\%$

Especificidade = $73/73 \times 100 = 100\%$

Valor Preditivo Positivo = $122/122 \times 100 = 100\%$

Valor Preditivo Negativo = $73/75 \times 100 = 97\%$

O processo de desidratação não altera as propriedades nutricionais do ovo “in natura”, como proteínas, lipídeos, vitaminas A, D, E, K e do complexo B e sais minerais^{11,12}.

Os resultados das culturas utilizando o meio teste mostraram sensibilidade de 98% e especificidade de 100% (Tabela 2). Os valores de sensibilidade e especificidade de um novo método devem se localizar entre o intervalo de 100 e 95%, para que o método seja considerado aceitável.

As culturas que resultaram positivas, mostraram crescimento de *M. tuberculosis* e outras micobactérias igualmente nos dois meios, indicando que o meio teste tem características semelhantes ao meio convencional, que possibilitam o crescimento das várias espécies de micobactérias.

O cálculo dos valores preditivos positivos e negativos foram de 100% e 97% respectivamente (Tabela 2), indicando que com o meio teste não houve detecção de falsos-positivos, e que ocorreram 2 falsos-negativos. Esses resultados mostram não haver diferenças significativas entre os dois tipos de meios comparados, quanto ao isolamento e crescimento de micobactérias, tanto para amostras de escarro como para materiais extrapulmonares.

O custo do ovo desidratado no comércio é ligeiramente inferior ao do ovo fresco.

Conclui-se que o ovo desidratado é uma alternativa viável que propicia a simplificação na preparação do meio, além de facilitar a programação de compra e armazenamento, com custo equivalente ao do ovo fresco.

RIALA6/903

Pedro, H.S.P. *et al.* Dehydrated egg to replace “in natura” egg in the preparation of Löwenstein-Jensen medium for mycobacteria culture. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):125-128, 2001.

ABSTRACT. Bacteriological methods are the most important to diagnose pulmonary tuberculosis. The culture medium most used to isolate mycobacteria is Löwenstein-Jensen (LJ), which is a solid medium containing eggs, glycerol and asparagine as carbon and nitrogen source. The eggs used to prepare the medium need a previous cleaning, consisting of brushing with water and soap, and decontamination with 70% alcohol during 30 minutes. This procedure takes time; besides it is not so

simple to organize the acquisition of fresh eggs. With the purpose of simplifying the whole procedure of making medium, we propose the replacement of "in natura" by dehydrated eggs. This study compares the performance of conventional LJ and LJ made with dehydrated eggs. Clinical specimens sent to the laboratory for tuberculosis diagnosis were decontaminated by Petroff method and inoculated in tubes of conventional LJ and the test LJ. It was used 200 clinical specimens, 150 were smear positive and 50 smear negative. Among the 150 samples smear positive 123 were positive in traditional LJ and 24 were culture negative, while in the test LJ 121 were positive and 26 were negative. The difference was not significant. Three cultures were contaminated in both media. Comparison of the two media showed a sensibility of 98% and specificity of 100% The conclusion is that the dehydrated egg could be an alternative way to make LJ medium, propitiating a simpler and more practical medium preparation.

KEY WORDS. culture medium, Löwenstein-Jensen, tuberculosis, dehydrated egg.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Stop TB and the source. WHO report on the tuberculosis epidemic. Geneva: WHO publication WHO/TB/95.183, 1995.
2. Aoki, Y.; Yamada, H. Clinical application of microplate DNA-DNA hybridization procedure for rapid diagnosis of mycobacterial infections. **Tubercle and Lung Dis.**, 75:213-219, 1994.
3. Barnes, P.E. Rapid diagnostic tests for tuberculosis progress but no gold standard. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155:1497-1498, 1997.
4. Eisenach, K.D.; Cave, D.; Bates, J.J.; Crawford, J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, 161:977-981, 1990.
5. Guerrero, C. *et al.* A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. **J. Clin. Microbiol.**, 32(2):304-307, 1995.
6. Thierry, D. *et al.* IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids. Res.**, 18(1):188, 1990.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2ª edição, Rio de Janeiro, 1994.
8. Karel, M. Dehydration of food. In: Karel, M.; Senenna, O.R.; Lund, D.B. **Principles of Food Science, part II**, p.342-346, Owen R. Senenna Ed., New York, 1975.
9. Bier, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24ª edição. São Paulo. Melhoramentos, 1985. p. 1062.
10. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz; Faculdade de Saúde Pública da USP. **Microbiologia Aplicada ao Diagnóstico de DST/AIDS**, 100p, 1994.
11. Gava, J.A. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. Livraria Nobel S.A., São Paulo, 1984, p. 312.
12. Brennan, J.G.; Butter, J.R.; Cowell, N.D.; Lilly, A.E.V. **Las operaciones de la ingeniería de los alimentos**. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1980, p.341-9.

Recebido em 02/08/2001; Aprovado em 07/02/2002

Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa

Evaluation of analytical methods for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography

Adriana de Q. OLIVEIRA¹
Lucia M. VALENTE SOARES^{1*}

RIALA6/904

Oliveira, A.Q.; Valente Soares, L.M. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):129-134, 2001.

RESUMO. Sistemas de extração e limpeza foram avaliados para a determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. O método de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares (1995), combinado com uma coluna de limpeza preconizada por Romer (1986), foi o sistema que apresentou melhores resultados. Para extração foi usado metanol: cloreto de potássio 4% (9:1) seguido por clarificação com sulfato de amônio 30% e partição com diclorometano. A seguir, o extrato foi passado pela coluna de alumina: carvão (2,3:1,9) e os tricotecenos eluídos com acetonitrila: água (84:16). O extrato, após reação de derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) em piridina, foi injetado em um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama. As recuperações médias obtidas foram 72% para desoxinivalenol (DON), 88% para diacetoxiscirpenol (DAS) e 87% para toxina T2 (T2). Os limites de detecção obtidos foram 30 ng/g para DON, 50 ng/g para DAS e 40 ng/g para T2. Os coeficientes de variação médios para amostras artificialmente contaminadas, com 500 ng/g de cada toxina foram 9,8, 6,3 e 6,6% para DON, DAS e T2, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE. Milho, micotoxinas, tricotecenos, desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina T-2.

INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são uma família de micotoxinas caracterizadas por um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno. Estas micotoxinas são compostas com funções éster e álcool na porção externa da molécula. Possuem uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupo epóxido entre os carbonos 12 e 13. Os tricotecenos são produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*,

Verticimonosporium, *Stachybotrys* e *Trichothecium*¹⁹. Um total de 148 tricotecenos são conhecidos. Porém, apenas alguns deles foram observados ocorrendo naturalmente, como por exemplo, o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T2 (T2), a toxina HT2 (HT2) e o diacetoxiscirpenol (DAS)⁶.

Cereais podem ser contaminados por diversas espécies de *Fusarium* e, desta maneira, torna-se a via pela qual estas toxinas entram na alimentação humana e animal. Dentre os vários cereais, o trigo e o milho têm sido apontados como mais

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

*¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13081-970 Campinas, SP. e-Mail: valente@fea.unicamp.br

contaminados. O DON tem sido o tricoteceno mais freqüentemente encontrado nos cereais⁸.

Os sintomas característicos dos efeitos tóxicos dos tricotecenos em humanos e animais são vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas seguidos ou não de morte^{17,20}. A doença em humanos que está associada a estes sintomas chama-se Aleucia Tóxica Alimentar (ATA). Casos fatais desta doença ocorreram em 1913 e após a Segunda Guerra Mundial em populações localizadas em regiões da antiga Rússia^{12,17,19}.

Por estarem presentes em traços nos alimentos destinados ao consumo humano e rações animais, métodos analíticos sensíveis e específicos tornam-se necessários. O primeiro método desenvolvido para a determinação de tricotecenos em grãos foi por cromatografia em camada delgada (CCD) e os tricotecenos foram visualizados após o uso de reagentes reveladores. Um deles, o cloreto de alumínio, foi amplamente empregado para tricotecenos do grupo B⁸. A determinação de tricotecenos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é difícil em virtude da falta de absorção na faixa do ultra-violeta (UV), exceto para tricotecenos do grupo B. Para tricotecenos do grupo A, CLAE, com detecção por UV, é aplicada somente para amostras com altas concentrações de toxina. Vários pesquisadores descreveram a determinação de tricotecenos por CLAE após derivação. A desvantagem deste método está na presença de picos dos reagentes de derivação que interferem com os picos de alguns tricotecenos^{8,9,11}. Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia gasosa (CG) é a técnica mais empregada na determinação de tricotecenos em diversos tipos de amostras, com detecção por captura de elétrons (CE), espectrômetro de massas (EM) ou por ionização em chama (IC), respectivamente nesta ordem.

A cromatografia gasosa (CG), apesar de necessitar de extensas e trabalhosas etapas de limpeza, oferece alta resolução na separação através do emprego de colunas capilares. A seletividade e sensibilidade vão depender do sistema de detecção empregado. A versatilidade da CG facilita o desenvolvimento de métodos para análises de rotina no caso de amostras contendo vários tricotecenos². Esta técnica inclui etapas de extração, limpeza, e na maioria dos casos, uma reação de derivação compatível com o sistema de detecção utilizado. Os solventes empregados na etapa de extração são de caráter polar, como o metanol e a acetonitrila em misturas com água. Quando a extração é feita com metanol, uma etapa de clarificação se faz necessária. Um dos agentes precipitantes mais utilizados é o sulfato de amônio. Dependendo do tipo de amostra, quando muito gordurosa, há a necessidade de uma etapa de desengorduramento, normalmente, com n-hexano. Na etapa de limpeza, ou isolamento das toxinas, é comum o emprego de colunas de extração em fase sólida (SPE), e os adsorventes mais utilizados são carvão ativo, celite, alumina, sílica gel, Florisil individualmente ou em misturas^{3,7,10,13}.

A reação de derivação, previamente à separação cromatográfica a gás, é necessária para melhorar a volatilidade e

outras propriedades cromatográficas dos tricotecenos. Os agentes de derivação mais empregados para tricotecenos são o anidrido trifluoroacético (TFAA), o heptafluorobutirilimidazol (HFBI), o anidrido heptafluorobutírico (HFBA) e o pentafluoropropionilimidazol (PFPI).

Tendo em vista que dentre as técnicas cromatográficas a cromatografia gasosa oferece melhor resolução e sensibilidade na determinação de tricotecenos, o presente trabalho avaliou os métodos disponíveis, para este grupo de toxinas, baseados nesta técnica que melhor se adaptassem às condições dos laboratórios nacionais em termos de simplicidade, baixo custo de reagentes e uso de instrumentos mais facilmente encontrados em nossos laboratórios. Como detector foi escolhido o de ionização de chama (FID) por este ser mais comum em laboratórios nacionais que detectores de captura de elétrons, apesar do último ter sido muito mais utilizado com tricotecenos. A adequação do FID, no entanto, foi demonstrada em trabalhos anteriores³⁻⁵. O DON, o T2 e o DAS foram os tricotecenos selecionados para os testes devido ao primeiro ter sido o mais encontrado em cereais no mundo todo e o fato dos dois últimos serem os mais tóxicos dentre os tricotecenos não macrocíclicos¹⁹. As etapas seguidas na avaliação de metodologia foram: (a) avaliação de agentes de derivação, b) avaliação de sistemas de extração e limpeza para amostras de milho, e c) validação da metodologia escolhida para determinação de DON, DAS e T2 em milho.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Amostras de milho pipoca foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 80 mesh, acondicionadas em recipientes de vidro e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

2. Padrões

As soluções estoque individuais de cada tricoteceno – DON, T2 e DAS – (Sigma) foram preparadas pesando-se 1 mg da cada toxina, dissolvendo em 10 mL de benzeno, segundo Furlong & Soares³, e obtendo-se a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. As soluções trabalho foram preparadas em concentração 40 $\mu\text{g/mL}$ para cada toxina e acondicionadas em frascos âmbar vedados e armazenados a -18°C .

Metil araquidato (Poly Science) foi usado como padrão interno e a solução estoque foi preparada pesando-se 5 mg de metil araquidato, dissolvendo em 10mL de n-hexano (grau cromatográfico) obtendo-se a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. A solução trabalho foi preparada em concentração 100 $\mu\text{g/mL}$. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar vedado e armazenado a -18°C .

3. Reagentes e Adsorventes

Anidrido trifluoroacético (Merck), Heptafluorobutirilimidazol (Pierce), carvão ativo (60 mesh e 100-400 mesh/

Sigma), celite, alumina, Florisil (100-400 mesh/Merck), Amberlite IRP-64 (100-400 mesh/Sigma), Amberlite CG-50 (100-200 mesh/Sigma) e Amberlite IR-120 (Merck).

4. Condições Cromatográficas

Foi empregado um cromatógrafo a gás (Varian, modelo Star 3400cx, com detector de ionização em chama e injetor modelo 1078. Coluna capilar DB-1701 (J & W Scientific) com 15 metros de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (14% cianopropilfenilmetil polisiloxano), nas seguintes condições: temperatura do injetor (275 °C), temperatura do detector (300 °C), programação da coluna (100 °C/1 min, 6 °C/min até 220 °C/20 min), vazão do gás de arraste (3,6 mL/min) e fluxo de limpeza do injetor (50 mL/min). O volume de injeção foi 1 µL, o modo de injeção *splitless* e o tempo de *splitless* (0,75 min). Software de integração dos dados, Varian Star versão 4.5.

5. Avaliação de Reagentes de Derivação

Dois agentes de derivação foram testados o HFBI (heptafluorobutirilimidazol) e o TFAA (anidrido trifluoroacético).

5.1. Derivação com HFBI: esta derivação foi realizada conforme o método de Furlong & Soares (1995)³.

Tabela 1. Sistemas de extração e limpeza testados na determinação de tricotecnos em milho.

Solvente de extração	Etapas de limpeza de extrato
Metanol:4% KCl (9+1) ³	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para clorofórmio ³ Coluna carvão:alumina:celite (0,7:0,5:0,3) ³
Metanol:4% KCl (9+1) ³	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para clorofórmio ³ Coluna Florisil (2g)
Metanol:4% KCl (9+1) ³	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para clorofórmio ³ Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³
Acetonitrila:água (84+16) ⁷	Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³
Acetonitrila:água (3+1) ¹⁸	Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³
Acetonitrila:água (85+15) ⁹	Coluna alumina:carvão:resina trocadora de íons (20+1+40) ⁹
Acetonitrila:água (85+15) ⁹	Coluna alumina:carvão:resina trocadora de íons (2,3+1,9+2,0)
Acetonitrila:água (3+1) ¹⁸	Coluna alumina:carvão:resina trocadora de íons (2,3+1,9+2,0)
Metanol ¹⁴	Coluna C18 ¹⁴ Coluna sílica gel ¹⁴
Metanol:água (1+1) ¹⁵	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ¹⁵ Partição para acetato de etila ¹⁵ Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³
Metanol:água (7+3) ¹⁶	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ¹⁶ Partição com acetato de etila ¹⁶ Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³
Metanol:4% KCl (9+1) ³	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para diclorometano Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³

5.2. Derivação com TFAA: para este reagente de derivação duas bases foram testadas, o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e a piridina.

5.2.1. Reação em presença de bicarbonato de sódio (TFAA/NaHCO₃): 20 mg de NaHCO₃ e 200 µL de TFAA foram adicionados a um resíduo de padrão ou amostra e levados ao banho-maria a 60 °C por 60 minutos. Após esfriar, n-hexano foi adicionado e a seguir a mistura foi evaporada. Foram adicionados 500 µL de tolueno e duas vezes 1000 µL de água deionizada. Uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um frasco contendo o padrão interno e a solução foi seca. O derivado seco foi ressuspensionado em 100 µL de n-hexano e injetado no cromatógrafo a gás.

5.2.2. Reação em presença de piridina (TFAA/piridina): Foram adicionados 1000 µL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200 µL de TFAA ao resíduo de padrão ou amostra e levados ao banho-maria a 60 °C por 60 minutos. Foram então adicionados 2 vezes 1000 µL de KH₂PO₄ 5%. Uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um frasco contendo padrão interno. A solução foi seca, ressuspensionada com 100 µL de n-hexano e análise cromatográfica realizada.

6. Avaliação de Sistemas de Extração e Limpeza

Os sistemas de extração e limpeza testados estão dispostos na Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Escolha do reagente de derivação e otimização de condições

Dois reagentes de derivação foram escolhidos para teste devido ao seu amplo uso na determinação de tricotecnos, o heptafluorobutirilimidazol (HFBI) e o anidrido trifluoroacético (TFAA). Um outro grupo de reagentes, os agentes de silição, foram ignorados devido ao fato de muito rapidamente causarem depósitos no detector aumentando as despesas com a manutenção do instrumento.

A derivação do DON com HFBI gerou um cromatograma com poucos picos além do tri-heptafluorobutiril desoxinivalenol (DON-tri-HFB) e do padrão interno (Pi). A área relativa (Área_{DON}/Área_{Pi}) obtida foi 1,24. A derivação do DON com TFAA em presença de bicarbonato de sódio produz o tri-trifluoroacetil desoxinivalenol (DON-tri-TFA). O cromatograma resultante apresentou menos picos que o gerado com o HFBI. A reação produziu um derivado para o qual o detector apresentou maior sensibilidade, em virtude do aumento da área relativa (Área_{DON}/Área_{Pi}). Com este sistema de derivação, a (Área_{DON}/Área_{Pi}) obtida foi 1,82. A reação de DON com TFAA foi também testada em presença de piridina. O composto formado, como anteriormente, foi o DON-tri-TFA. Houve um aumento na área relativa (Área_{DON}/Área_{Pi}), que passou de 1,82 para 2,62. Este aumento proporcionou a utilização de quantidades bem menores de solução padrão dos tricotecnos, aumentando assim a sensibilidade do método. Portanto, em virtude desta vantagem apresentada pelo sistema de derivação TFAA/piridina em comparação com o HFBI,

o primeiro foi o sistema escolhido para as derivações dos tricotecenos no presente trabalho (Figura 1).

2. Avaliação de sistemas de extração e limpeza

Vários sistemas de extração e limpeza foram testados (Tabela 1) e a maioria apresentou desde dificuldades de execução, tais como formação de grânulos no fundo da vidraria, dissolução incompleta em etapas de re-suspensão e ainda presença visível de gordura nos extratos. Nas diferentes colunas de limpeza, variantes dos solventes de eluição propostos foram também testados. Uma etapa de desengorduramento foi acrescentada nos casos em que a presença de gordura era observada e esta foi realizada previamente à análise em aparelho de Goldfisher por 3 horas.

Para limpeza, três tipos de resinas trocadoras de íons (Amberlite IR-120, IRP-64 e CG-50) foram testadas na montagem das colunas. Todas as colunas precisaram ser eluídas sob vácuo, em virtude da granulometria tanto do carvão (100-400 mesh) como das resinas Amberlite IRP-64 (100-400 mesh) e CG-50 (100-200 mesh). Os testes de recuperação realizados com padrão de toxina T2 puro nas colunas apresentaram baixos resultados, isto é, a toxina ficava retida na coluna. A coluna que continha a resina Amberlite IR-120 reteve 37% da toxina, já as resinas Amberlite IRP-64 e CG-50 retiveram 83% e 77% respectivamente.

Dos diversos sistemas testados o único a apresentar uma recuperação adequada, acompanhada de cromatogramas sem interferentes e ausência de dificuldades de execução, foi método de extração descrito por Furlong & Sores (1995)³, combinado com a coluna de limpeza de Romer (1986)¹³. O método resultante está descrito a seguir.

Homogeneizar cinquenta gramas de amostra com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% por 5

minutos em liquidificador. Filtrar, tomar uma alíquota de 150 mL e proceder à clarificação com 150 mL de sulfato de amônio 30% e 50 cm³ de celite. Novamente tomar uma alíquota de 150 mL e colocar em um funil de separação já contendo 150 mL de água destilada. Realizar a partição, lentamente por 3 minutos, com 15 mL de diclorometano. Deixar em repouso por 10 minutos e recolher toda a fase orgânica em um bquer de 50 mL. Proceder novamente à partição e recolher a fase orgânica no mesmo bquer anterior. Agitar por 20 segundos em ultra-som para homogeneizar os extratos. Tomar uma alíquota de 15 mL secar em banho de água a 50 °C e proceder à etapa de limpeza. O volume restante (extrato B) secar e guardar (a -18 °C) para realizar reações de confirmação de identidade quando a amostra estiver contaminada.

Para limpar o extrato A seco, dissolvê-lo com 5 x 1 mL de acetonitrila:água (84:16) e aplicá-lo na coluna de alumina:carvão (2,3:1,9). A coluna deve ser previamente preparada em uma coluna de vidro com 1,5 cm de diâmetro interno e recheada a seco com 1,1 cm de alumina seguida de 4,0 cm de carvão ativo e, em seguida, condicionada com 15 mL de acetonitrila:água (84:16). O topo e a base do recheio devem ser forrados com lã de vidro. Eluir a amostra com 40 mL de acetonitrila:água (84:16) a uma vazão de 1 mL/min. Concentrar o eluato, em banho de água a 80 °C, até cerca de 2 mL e transferi-lo quantitativamente para frasco de reação de 4 mL e secá-lo

Ao extrato seco adicionar 1 mL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200 µL de TFAA. Levar a banho de água a 60 °C por 60 minutos. Deixar esfriar a temperatura ambiente, adicionar 1 mL de KH₂PO₄ 5% e agitar por 30 segundos em ultra-som. Tomar uma alíquota de 850 µL e colocá-la em um segundo frasco contendo 1 mL de KH₂PO₄ 5% e agitar novamente. Tomar uma alíquota de 650 µL e juntá-la ao padrão interno (3 µg) num terceiro frasco. Secar a 50 °C sob leve fluxo de N₂. Re-suspender com 100 µL de n-hexano (grau cromatográfico) e analisar por cromatografia gasosa nas seguintes condições: temperatura injetor (275 °C), temperatura do detector (300 °C), programação da coluna (100 °C/1 min, 6 °C/min até 220 °C/20 min), vazão do gás de arraste (3,6 mL/min) e fluxo de limpeza do injetor (50 mL/min). O volume de injeção foi 1 µL, o modo de injeção *splitless* e o tempo de início para a purga (0,75 min).

As Figuras 2 e 3 mostram cromatogramas de amostras analisadas por este sistema.

3. Validação intralaboratorial da metodologia escolhida para determinação de tricotecenos em milho

A recuperação e a repetibilidade foram testadas em amostras artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada tricoteceno (DON, DAS, T2). As amostras, assim contaminadas, foram extraídas e clarificadas de acordo com o método de Furlong & Soares (1995)³, passadas pela coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) Romer (1986)¹³, eluídas com acetonitrila:água (84:16) e derivadas com TFAA-piridina.

Dezoito repetições foram realizadas para se obter os valores médios de recuperação e repetibilidade do método. Os

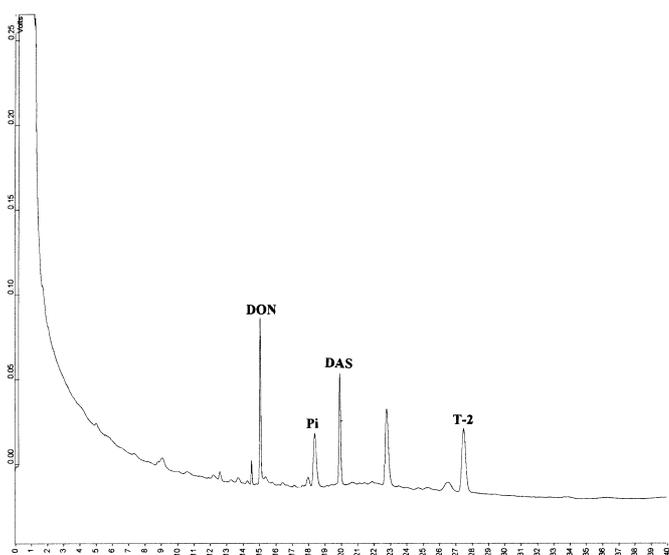


Figura 1. Perfil cromatográfico de uma mistura de padrões de DON, DAS e T2 derivados com TFAA em presença de piridina.

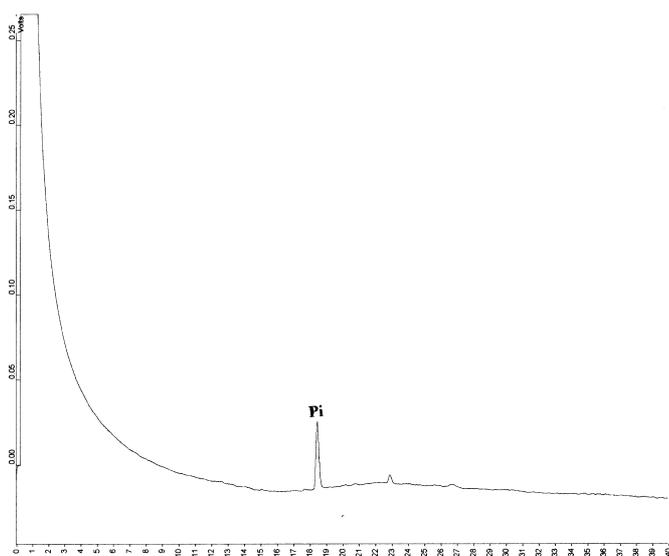


Figura 2. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho pipoca não contaminada utilizando o sistema de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares³ combinado à coluna de limpeza de Romer¹³ (Pi = padrão interno) e submetida à derivação com TFAA.

valores médios de recuperação foram 72% para DON, 88% para DAS e 87% para T2. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 9,8% para DON, 6,3% para DAS e 6,6% para a T2. As curvas de calibração do DON, da T2 e do DAS foram lineares de 10 a 65 ng/ μ L, de 10 a 65 ng/ μ L e de 10 a 85 ng/ μ L respectivamente.

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com o sugerido pela “American Chemical Society”¹ com a seguinte modificação: em vez de medir o ruído em um cromatograma de uma amostra não contaminada (um branco), uma amostra não contaminada foi fortificada com padrão de cada tricoteceno (DON, DAS e T2), derivada com TFAA-piridina e injetada 5 vezes no cromatógrafo gasoso. O desvio padrão (RSD) destas injeções foi então calculado fornecendo uma medida do ruído do instrumento nas condições usadas na análise. Esta maneira de medir ruído é usada em alguns campos de espectroscopia²¹ e é de obtenção mais simples para o analista e o ruído de curto prazo é o mesmo para amostra ou linha de base conforme pode ser observado na prática quando níveis baixos do analito, próximos ao limite de detecção, são empregados. O limite de detecção de cada tricoteceno foi determinado como sendo a menor quantidade capaz de gerar um sinal três vezes maior que o ruído. O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Os limites de detecção do método proposto foram 30, 50 e 40 ng/g e os de quantificação foram 150, 250 e 200 ng/g para DON, DAS e T2, respectivamente.

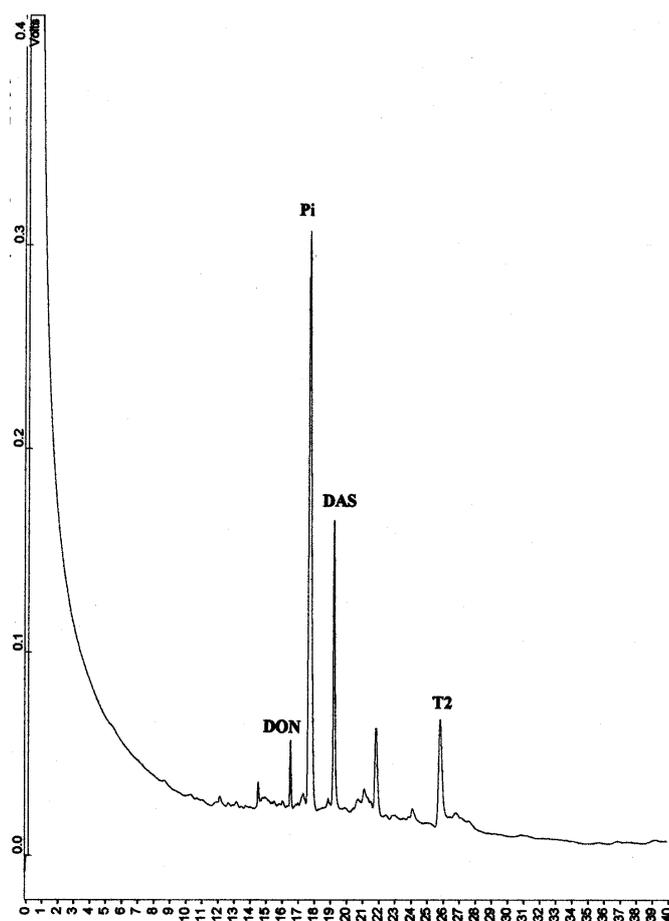


Figura 3. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho pipoca não contaminada enriquecida com padrões de DON, DAS e T2 e extraída e limpa pelo sistema de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares³ combinado à coluna de limpeza de Romer¹³ (Pi = padrão interno) e submetida à derivação com TFAA.

CONCLUSÕES

Quanto ao método de extração e limpeza, o melhor resultado da combinação do sistema de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares (1995)³ combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) preconizada por Romer (1986)¹³.

Avaliação intralaboratorial incluiu recuperação e repetibilidade as quais foram testadas em amostras contaminadas com 0,5 μ g/g de cada tricoteceno (DON, DAS T2). Os valores médios de recuperação foram 72% para DON, 88% para DAS e 87% para T2. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 9,8% para DON, 6,3% para DAS e 6,6% para a T2. As curvas de calibração do DON, da T2 e do DAS foram lineares de 10 a 65 ng/ μ L, de 10 a 65 ng/ μ L e de 10 a 85 ng/ μ L respectivamente. Os limites de detecção obtidos para cada tricoteceno foram 30 ng/g para DON, 50 ng/g para DAS e 40 ng/g para T2.

Dos reagentes de derivação testados, heptafluorobutirilimidazol (HFBI) e anidrido trifluoroacético (TFAA), o TFAA gerou melhores resultados, cromatogramas limpos e necessitou de menores quantidades de padrão de tricotecenos, tornando o método mais sensível.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora, A.Q. Oliveira agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos concedida.

RIALA6/904

Oliveira, A.Q.; Valente Soares, L.M. Evaluation of analytical methods for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):129-134, 2001.

ABSTRACT. Extraction and cleanup systems were evaluated for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography with flame ionization detector. The extraction and cleanup method described by Furlong & Soares (1995), combined with the Romer (1986) cleanup column exhibited the best results. The extraction used methanol: 4% potassium chloride (9:1), followed by a clarification with 30% ammonium sulfate, and partition with dichloromethane. The extract was then passed through an alumina:carbon column (2.3:1.9) and eluted with acetonitrile:water (84:16). Trifluoroacetic anhydride in the presence of pyridine was used for derivatization before injection in a gas chromatograph with an ionization detector. The average recoveries were 72% for deoxynivalenol (DON), 88% for diacetoxyscirpenol (DAS) and 87% for toxin T2 (T2). The detection limits were 30 ng/g for DON, 50 ng/g for DAS and 40 ng/g for T2. The average coefficients of variation for spiked samples at the 500 ng/g level were 9.8, 6.3 e 6.6% for DON, DAS, and T2, respectively.

KEY WORDS. Corn, mycotoxins, trichothecenes, deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, toxin T2.

REFERÊNCIAS

1. American Chemical Society. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Anal. Chem.**, 52:2242-2249, 1980.
2. Croteau, S.M.; Prelusky, D.B.; Trenholm, H.L. Analysis of trichothecenes mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. **J. Agric. Food Chem.**, 42:928-933, 1994.
3. Furlong, E.B.; Soares, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **J. AOAC Int.**, 78:386-390, 1995.
4. Furlong, E.B.; *et al.* Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Add. Contam.**, 12:683-688, 1995.
5. Furlong, E.B.; *et al.* Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, 131:185-190, 1995.
6. Kotal, F.; *et al.* Determination of trichothecenes in cereals. **J. Chromatogr. A.**, 830:219-225, 1999.
7. Langseth, W.; Clasen, P.E. Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal-alumina column. **J. Chromatogr. A.**, 603:290-293, 1992.
8. Langseth, W.; Rundberget, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **J. Chromatogr.**, 815:103-121, 1998.
9. Lauren, D.R.; Greenhalgh, R. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 70:479-483, 1987.
10. Marochi, M.A.; Soares, L.M.V. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Bol. S.B.C.T.A.**, 27:1-8., 1993.
11. Maycock, R., Utley, D. Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 347:429-433, 1985.
12. Osborne, B.G. Mycotoxins and the cereals industry – a review. **J. Food Tech.**, 17:1-9, 1982.
13. Romer, T.R. Use of small charcoal/alumina clean-up columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 69:699-703, 1986.
14. Rosen, R.T.; Rosen, J.D. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas-chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **J. Chromatogr.**, 283:223-230, 1984.
15. Scott, P.M.; Lau, P.Y.; Kanhere, S.R. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 64:1364-1371, 1981.
16. Scott, P.M.; Kanhere, S.R.; Tarter, E.J. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron-capture gas chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 69:889-893, 1986.
17. Snyder, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **J. Food Prot.**, 49:544-569, 1986.
18. Tanaka, T. *et al.* Improved methodology for simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. **Food Add. Contam.**, 2:125-137, 1985.
19. Ueno, Y. (ed). Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Tokyo, Kodansha-Elsevier, 1983, 313 p.
20. Ueno, Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. **Reviews in Environmental Toxicology 2**, Amsterdam, p. 303-341, 1986.
21. Van Loon, J.C. Analytical atomic absorption spectroscopy. New York, Academic Press, 1980, 337 p.

Recebido em 15/03/2001; Aprovado em 07/03/2002

Avaliação de resíduos de Endosulfan em matriz de vagem e soja para comparação de dois sistemas de aplicação do produto formulado

Evaluation of Endosulfan residue in pod and soybean matrices for comparison of two application systems of formulated product

Célia M.D. CORRÊA¹
Jorge J. do V. OLIVEIRA²
Valdemar L. TORNISIELO³

RIALA6/905

Corrêa, C.M.D.; Oliveira, J.J.V.; Tornisielo, V.L. Avaliação de resíduos de Endosulfan em matriz de vagem e soja para comparação de dois sistemas de aplicação do produto formulado. **Rev Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):135-139, 2001.

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi determinar os níveis de resíduos de α -endosulfan, β -endosulfan e sulfato de endosulfan na vagem e no grão de soja. A soja foi cultivada em uma área de 900 m², dividida em três parcelas iguais, sendo uma parcela reservada para a soja testemunha, sem aplicação de endosulfan, e as outras duas reservadas para pulverização deste inseticida por meio do sistema manejo integrado de pragas (MIP) e do sistema convencional. Os níveis de resíduos de endosulfan foram quantificados por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (Ni⁶³). Foram encontrados na vagem cerca de 6 e 7 vezes mais resíduos de endosulfan total do que no grão de soja, nos sistemas MIP e convencional, respectivamente. Em ambos os sistemas, não foram detectados a presença de sulfato de endosulfan dentro do limite de quantificação do método de 0,5 mg/kg para o grão de soja e 0,1 mg/kg para a vagem de soja. Em relação aos resultados obtidos conclui-se que a vagem apresentou um efeito protetor à penetração do inseticida no grão. Ambos os sistemas foram eficientes no combate às pragas, porém sugere-se o uso do MIP porque resultou em menor contaminação do grão. A soja estava adequada para consumo em relação à Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas.

PALAVRAS-CHAVE. Resíduos de endosulfan, soja, vagem, sistemas convencional e MIP.

INTRODUÇÃO

Entre os produtos agrícolas que alimentam a população mundial, a soja vem apresentando extraordinária expansão e

ocupando uma posição de destaque entre os produtos agrícolas. Isto porque esta leguminosa é um alimento que apresenta um alto valor nutritivo, com uma composição química rica em óleos, vitaminas, alguns minerais como cálcio e ferro e teor

¹ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Departamento de Ecotoxicologia – BIOAGRI Laboratórios Ltda. – Piracicaba/SP. (e-mail: cdcorrea@bioagri.com.br).

² Químico, Pesquisador Científico, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada. Campinas/SP. (e-mail: jorgejvo@ital.org.br).

³ Seção de Ecologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP – Piracicaba/SP. (e-mail: vltornis@cena.usp.br)

protéico superior a 34%. Destaca-se também como uma cultura de alta produtividade e fácil adaptação em quase todas as regiões do globo^{2,4,11}.

Apesar dos aspectos promissores, a cultura da soja, praticamente durante todo o seu ciclo, está sujeita ao ataque de insetos que podem diminuir significativamente a produtividade acarretando prejuízo para o sojicultor^{5,10}. A aplicação de agrotóxicos no sistema convencional tem sido uma das providências necessárias para neutralizar o ataque desses insetos e pragas e viabilizar a produção de soja. Também o emprego de agrotóxico associado ao tratamento através do manejo integrado de pragas (MIP) é uma outra alternativa para combater essas adversidades.

O MIP consiste em inspeções regulares às lavouras para verificar o nível de ataque, com base na desfolha, no número e tamanho da população das pragas. Esta prática é feita com pano de batida, técnica que consiste em bater duas linhas de cultivo em direção ao pano branco de dimensões 0,5 x 1,0 m, colocado na entrelinha, junto ao solo, fazendo com que os insetos caiam no pano, possibilitando ser contados e avaliados quanto ao estágio de crescimento⁵.

Embora a aplicação de agrotóxico seja imprescindível para combater os insetos, dependendo da forma como é administrado e devido as suas propriedades toxicológicas, o mesmo pode causar danos à saúde do consumidor. No caso da cultura da soja, o agrotóxico endosulfan tem se mostrado eficiente para o controle de grande variedade de pragas. Apesar da proibição do uso dos organoclorados na agricultura, Portaria 95/85 de 21/11/1985, o endosulfan teve seu uso liberado, porém restrito a algumas culturas, entre elas a soja, mediante prescrição do receituário agrônomo³.

Em função destes aspectos, o objetivo deste trabalho foi quantificar os níveis de resíduos dos isômeros α -endosulfan e β -endosulfan e de seu principal metabólito, sulfato de endosulfan, na vagem e nos grãos de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo da soja e aplicação de endosulfan

A soja de variedade IAC 8-2 foi cultivada no campo experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo em uma área de 900 m², isenta de qualquer aplicação anterior de endosulfan. Esta área foi dividida em três parcelas iguais de 300 m², sendo uma parcela reservada para o cultivo da soja testemunha (sem aplicação do inseticida) e as outras duas reservadas para os tratamentos nos sistemas MIP e convencional, os quais foram submetidos a pulverizações com o produto comercial Thiodan 35 CE (1,25 L/ha), aplicado nas doses recomendadas pela EMBRAPA⁵ de 371 g de i.a/ha e 1.113 g de i.a/ha, respectivamente.

Cada parcela apresentou uma população de 40 plantas/m², sendo o espaçamento adotado de 50 cm entre linhas e 5 cm entre plantas. A bordadura deixada foi de 2,5 m, com finalidade

de evitar a contaminação entre os tratamentos. Foram adotados para todas as parcelas os mesmos tratos culturais de preparação do solo. O plantio da soja foi realizado em março e a colheita efetuada em julho de 1997.

Coleta das amostras

Os grãos e as vagens foram amostrados em pós-colheita manuais, separados, homogeneizados em processador, acondicionados em frascos de vidro de 500 mL, fechados com tampas envolvidas em papel alumínio, transportadas em isopor com gelo até o laboratório e armazenados em freezer a -18 °C até a ocasião das análises.

Preparação dos padrões (α -endosulfan, β -endosulfan e sulfato de endosulfan)

Foram utilizados os padrões de α -endosulfan, β -endosulfan e sulfato de endosulfan da Hoechst Schering Agrevo, Frankfurt, todos com índice de pureza de 99%. Foram preparadas em hexano grau resíduo soluções de 100 mg/L dos três padrões. Em seguida, foram preparadas soluções de concentrações 10 mg/L, 5,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L e 0,005 mg/L, a partir das soluções estoques.

Método de extração de endosulfan na vagem e na soja

O método de Luke *et al.*⁸ foi empregado para extração de α -endosulfan, β -endosulfan e sulfato de endosulfan na soja e na vagem, segundo descrito a seguir.

Pesou-se 10 g da amostra (vagem ou soja) em erlenmeyer, adicionou-se 150 mL de acetona para resíduo e agitou-se em agitador horizontal durante 60 minutos. Sob pressão reduzida, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 5, transferido para um balão volumétrico e completado o volume para 200 mL com acetona.

Uma alíquota de 20 mL deste extrato foi transferida para um funil de separação de 500 mL, onde também foram colocados 40 mL de uma solução aquosa saturada com NaCl, seguido da adição de 100 mL da mistura dos solventes hexano:diclorometano (50:50 v/v).

O funil de separação foi vigorosamente agitado durante 5 minutos e deixado em repouso para separação das fases aquosa e orgânica.

Após separação das fases, a fase aquosa inferior foi transferida para outro funil de separação de 500 mL e a fase orgânica foi reservada (fase A). Adicionou-se na fase aquosa 40 mL de diclorometano, agitou-se durante 1 minuto e deixou-se em repouso até separação das fases. Descartou-se a fase aquosa e a fase orgânica foi recolhida (fase B). As fases orgânicas (A e B) foram misturadas e filtradas em funil com sulfato de sódio.

O filtrado foi recolhido em balão de fundo chato de 125 mL, concentrado até aproximadamente 1 mL em rotavapor à temperatura de 40 °C e a seguir até à secura com N₂. O balão foi lavado com 10 mL de hexano para resíduo e o extrato transferido com pipeta Pasteur para um tubo concentrador, evaporado com N₂ até 1 mL e analisado por cromatografia a gás.

Fortificação e recuperação

Para determinação da recuperação, 10 g de amostras de vagem e de soja, ambas testemunhas, foram fortificadas com 1 mL de 1,0 mg/L e 0,1 mg/L com α -endossulfan e β -endossulfan; e 1 mL de 5,0 mg/L e 1,0 mg/L para sulfato de endossulfan na soja e na vagem, respectivamente. Após fortificação, o endossulfan foi extraído segundo metodologia descrita acima.

Quantificação de endossulfan na soja e na vagem

Para quantificação de α -endossulfan, β -endossulfan e sulfato de endossulfan foi utilizado o método do padrão externo. Os limites de quantificação do método, determinado experimentalmente, foram de 0,01 mg/kg para α -endossulfan e β -endossulfan, tanto na vagem como na soja, enquanto que para o sulfato de endossulfan foi de 0,1 mg/kg para a vagem e 0,5 mg/kg para a soja. As relações altura do pico/ruído do detector para os limites de quantificação de 0,01 mg/kg de α -endossulfan e β -endossulfan e 0,1 mg/kg de sulfato de endossulfan foram de 22, 16 e 11, respectivamente.

As curvas de calibração construídas com 4 pontos, nas quantidades injetadas de 0,005 ng, 0,010 ng, 0,015 ng e 0,020 ng para α -endossulfan e β -endossulfan e 0,05 ng, 0,10 ng, 0,15 ng e 0,20 ng para sulfato de endossulfan apresentaram coeficientes de linearidade de 0,9974, 0,9951 e 0,9947, respectivamente.

Para quantificação de endossulfan na soja e na vagem foi utilizado o cromatógrafo gasoso Varian 3.700 com coluna 5% SE-30 (100-120) Supelcoport (1,5 m de comprimento, 2 mm de diâmetro interno e 6 mm de diâmetro externo), equipado com detector de captura de elétrons (Ni^{63}) nas condições previamente otimizadas com injetor a 240 °C, detector 320 °C e coluna com temperatura programada de 150 °C durante 5 minutos, gradiente de temperatura de 10 °C/min até 240 °C (5 minutos) com atenuação de 32x10. Gás de arraste nitrogênio na pressão de 6,8 atm. Registrador Intralab operando a 2mv com velocidade do papel a 5 cm/hr.

Tabela 1. Recuperação de α -endossulfan, β -endossulfan e sulfato de endossulfan em amostras de soja (S) e vagem (V) fortificadas.

Metabólitos	Fortificação (mg/kg)	N		Recuperação (%)		Média		Desvio Padrão(±)		Coeficiente Variação (%)	
		S	V	Amplitude		S	V	S	V	S	V
				S	V						
α -endossulfan	0,1	4	3	(97 – 118)	(70 – 90)	107	80	10	10	9	12
	0.01	2	5	(111 – 114)	(100 – 120)	112	110	3	11	2	10
β -endossulfan	0,1	4	2	(79 – 93)	(103 – 113)	84	108	6	7	7	6
	0.01	5	4	(77 – 120)	(117 – 120)	97	118	15	1	16	1
Sulfato Endo.	0,1	NR	2	NR	(90 – 120)	NR	105	NR	21	NR	20
	0.5	3	NR	(116 – 116)	NR	116	NR	0	NR	0	NR

N – número de determinações. NR – não realizado. Sulfato Endo. – sulfato de endossulfan.

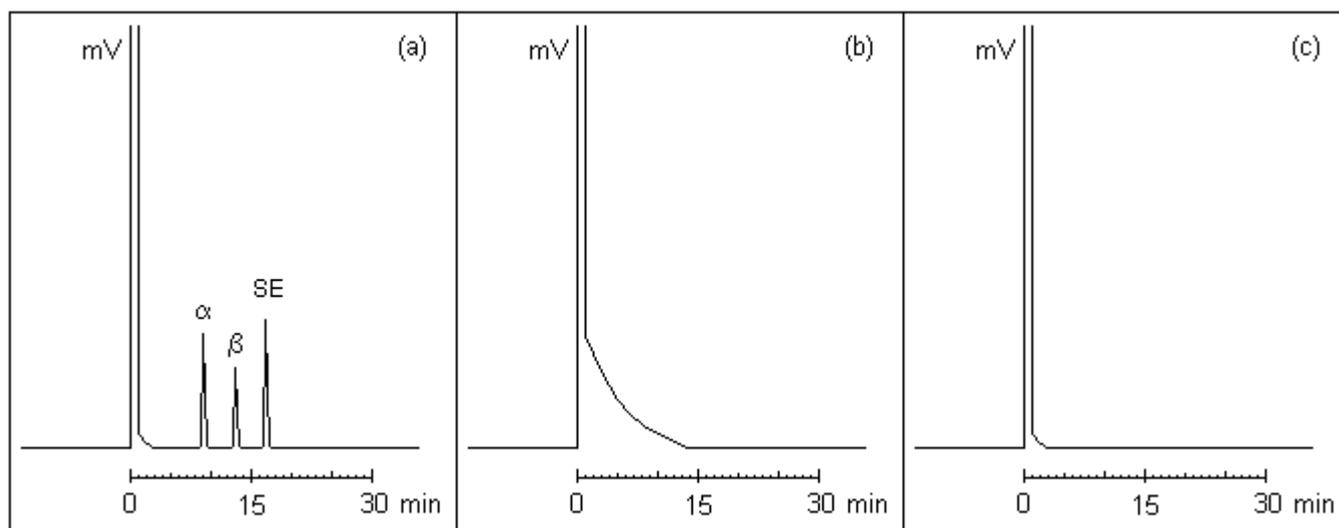


Figura 1. Cromatogramas com volumes de injeção de 3,0 μ L: (a) α -endossulfan (0,01 μ g/mL), β -endossulfan (0,01 μ g/mL) e sulfato de endossulfan (SE) (0,5 μ g/mL); (b) soja testemunha (1 g/5,0 mL); (c) vagem testemunha (1 g/10 mL). Condições cromatográficas (ver material e métodos).

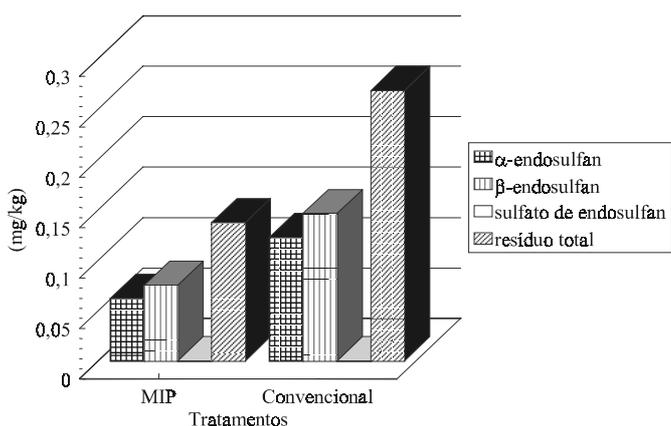


Figura 2. Níveis de resíduos de endosulfan nos grãos de soja tratados nos sistemas MIP e convencional.

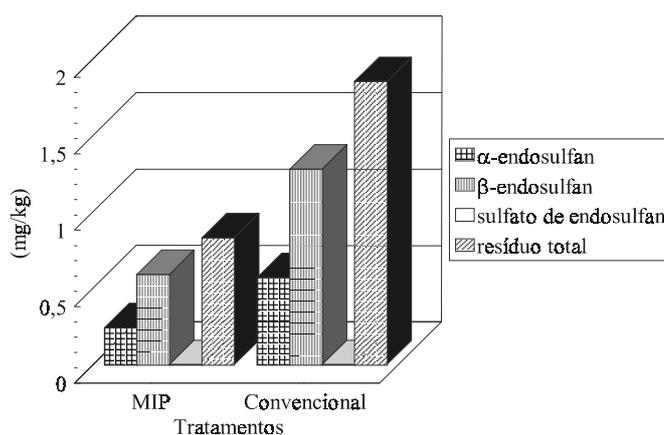


Figura 3. Níveis de resíduos de endosulfan na vagem tratada nos sistemas MIP e convencional.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Recuperações das análises de endosulfan na vagem e na soja

Utilizou-se o método de Luke *et al.*⁸, eliminando-se a limpeza dos extratos por cromatografia em coluna, porque os perfis cromatográficos dos extratos de soja e de vagem testemunhas não apresentaram picos interferentes, nos tempos de retenção dos isômeros e do metabólito do endosulfan (Figura 1).

Os resultados das recuperações de endosulfan nas amostras de vagem e soja encontram-se na Tabela 1. Verifica-se que as recuperações dos isômeros e do principal metabólito do endosulfan situam-se na faixa dos valores aceitos internacionalmente (70% a 120%)¹².

Resíduos de endosulfan na soja e vagem

Os níveis de resíduos de endosulfan no grão e na vagem de soja encontram-se ilustrados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Os alimentos são a principal fonte de exposição da maioria da população aos agrotóxicos, principalmente aqueles consumidos em média e grande quantidade. A soja está enquadrada como um destes alimentos. Por outro lado, a vagem sem os grãos, embora não seja utilizada como alimento, pode representar uma importante fonte de contaminação do ambiente, ou mais precisamente do solo, através da incorporação de restos culturais.

A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas estabelece 1,0 mg/kg como o Limite Máximo de Resíduo (LMR) para o endosulfan em soja, sendo este correspondente à soma de α -endosulfan, β -endosulfan e sulfato de endosulfan³. Conforme pode ser verificado na Figura 2 os níveis de resíduos de endosulfan total nos sistemas MIP e convencional estão abaixo do LMR estabelecido por esta legislação.

Os níveis de resíduos de endosulfan total encontrado no presente trabalho foram menores do que os níveis obtidos por Ferreira *et al.*⁶, em trabalho desenvolvido com soja pulveri-

zada uma e três vezes com endosulfan, na dosagem de 525 g i.a./ha. Estes pesquisadores detectaram níveis de endosulfan total de 0,256 mg/kg e 0,597 mg/kg para uma e três aplicações, respectivamente.

Os níveis de resíduos de endosulfan total na vagem nos sistemas MIP e convencional, foram respectivamente cerca de 6 e 7 vezes maiores do que os níveis encontrados nos grãos de soja.

No presente trabalho a maior quantidade de β -endosulfan em relação a α -endosulfan nas amostras de vagens e grãos, tanto no sistema MIP como no convencional, pode ser explicado pela fotodegradação, que segundo Lehr⁷, apenas o α -endosulfan sofre a descloração fotoquímica, enquanto que o β -endosulfan se apresenta como uma molécula mais estável.

Com respeito ao metabolismo em plantas, Maier-Bode⁹ conclui que o endosulfan é metabolizado na superfície da planta até o sulfato de endosulfan. Esta conclusão foi posteriormente confirmada por Aizawa¹. Em oposição aos estudos realizados por estes dois pesquisadores, verifica-se que de acordo com os resultados obtidos tanto para MIP, como para o sistema convencional, não foi detectada a presença de sulfato de endosulfan dentro do limite de quantificação do método de 0,5 mg/kg para soja e 0,1 mg/kg para a vagem. A ausência do sulfato de endosulfan indica que os isômeros α -endosulfan e β -endosulfan não sofreram oxidação em amostras de vagens e grãos. Como a oxidação é um processo químico diretamente ligado à exposição da molécula ao oxigênio, a presença do óleo, junto à molécula de agrotóxico, sugere que o mesmo possa estar atuando como uma barreira físico-química protetora, impedindo a interação entre oxigênio e o inseticida nas configurações isoméricas α -endosulfan e β -endosulfan.

A colheita de soja cultivada em ambos os sistemas foi satisfatória e durante todo o período de cultivo não ocorreu nenhuma incidência de pragas que pudesse inviabilizar a colheita final.

CONCLUSÕES

A vagem apresentou um efeito protetor à penetração de endosulfan no grão em ambos os sistemas.

O cultivo de soja através do sistema MIP é mais

aconselhável porque além de ter sido eficiente no combate às pragas, resultou em menor nível de contaminação.

O grão de soja está próprio para consumo, em ambos os sistemas, em relação à Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas.

RIALA6/905

Corrêa, C.M.D.; Oliveira, J.J.V.; Tornisielo, V.L. Evaluation of Endosulfan residue in pod and soybean matrices for comparison of two application systems of formulated product. **Rev Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):135-139, 2001.

ABSTRACT. The objective of this study was to evaluate the residue levels of the α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulphate in pod and soybean. Soybean was cultivated in 900m² divided in three equal parcels: control (without endosulfan), PIM and conventional system. The endosulfan residue levels were quantified by gas chromatography equipped with electron capture detector (Ni⁶³). It was showed 6 and 7 times more residues of total endosulfan in PIM and conventional systems, respectively, in pod than soybean. In both systems were not detected endosulfan sulphate within method quantified limit of 0,5 mg/kg and 0,1 mg/kg for soybean and pod, respectively. It concluded that pod showed protector effect to grains in both systems. Both treatments were efficient to pest control, however PIM was suggested to use in soybean because it results in low contamination level of food. The soybean was adequate for eat in relation at Pesticide Residue Brazilian Legislation.

KEY WORDS. Endosulfan residue, soybean, pod, conventional and PIM systems.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aizawa, H. **Metabolic maps of pesticides**. New York: Academic Press, 1982. 242 p.
2. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – ABIOVE. <http://www.abiove.com.br> (1998).
3. Brasil – Ministério da Saúde. **Relação de substâncias para uso domissanitário**: Portarias do Ministério da Saúde. 1985. São Paulo: International Life Sciences Institute – ILSI, 1995. 716p.
4. Costa, S.L. A soja na produção de alimentos. In: Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, 1978. **Anais**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979, v. 2, p. 235-243.
5. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil 1996/97**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996. 164 p.
6. Ferreira, M.S. *et al.* Resíduos de canfeclor, DDT, endrin, e endosulfan em grãos de soja. **Hig. Alim.**, 2(4): 201-209, 1983.
7. Lehr, W. **Statement concerning the chemical classification of endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 1993. p.1-3. (Report, PSR-93/034).
8. Luke, M.A.; Froberg, J.E.; Masumoto, H.T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hidrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 58(5): 1020-1026, 1975.
9. Maier-Bode, H. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. **Residue Reviews**, 22, p. 1-44, 1968.
10. Mariconi, F.A.M. **Algumas informações sobre endosulfan**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Zoologia, 1987. 19p.
11. Portela, F. **Bases bioquímicas para o melhoramento de variedades de soja (*Glycine max* (L) Merrill, 1977)**. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
12. Van Zoonen, P. (Ed.). **Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs**. 6. Ed. Netherlands: Ministry of Public Health, Welfare and Sport, 1996. Part 1, p. 1-22.

Recebido em 15/05/2001; Aprovado em 07/03/2002

Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP

Physicochemical and microbiological quality evaluation of the pasteurized milk processed by mini and microprocessing plants of the area of Ribeirão Preto, State of São Paulo – Brazil

Neusa S. GARRIDO^{1*}
José Mário T. MORAIS²
Rita de C. BRIGANTI¹
Maria Aparecida de OLIVEIRA¹
Alzira M.M. BERGAMINI¹
Solange A.V. de OLIVEIRA¹
Rosa M.D. FÁVARO¹

RIALA6/906

Garrido, N.S. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):141-146, 2001.

RESUMO. Foram analisadas, de 1995 a 1998, 390 amostras de leite (123 tipo C, 86 tipo B e 181 tipo Integral) provenientes de dezesseis mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP. Dentre essas usinas, dez foram submetidas a um estudo longitudinal, ou seja, as amostras de leite foram analisadas durante 4 anos, sendo que cada ano correspondeu a um período. Os estabelecimentos foram fiscalizados por um médico veterinário do Serviço de Inspeção de São Paulo que, mediante os resultados das análises de leite, orientava os responsáveis pelas usinas. Dentre o total de amostras estudadas, observou-se que estavam em desacordo com os padrões físico-químicos e microbiológicos, estabelecidos pela legislação em vigor, 15,5% e 32,5% do tipo C; 37,2% e 32,6% do leite tipo B e 30,9% e 31,0% do tipo Integral, respectivamente. Na avaliação das dez mini e micro-usinas estudadas durante os 4 anos observou-se, quanto a qualidade microbiológica, que o leite tipo B apresentou uma melhora a partir do terceiro período de estudo; o do tipo Integral também no terceiro período e o do tipo C mostrou uma maior redução na porcentagem de amostras em desacordo no segundo período e depois manteve níveis um pouco mais altos no decorrer do estudo. Os dados mostraram que a fiscalização e orientação resultaram em uma maior adequação nas condições higiênico-sanitárias do leite. O mesmo não foi observado em relação às características físico-químicas.

PALAVRAS-CHAVE. Leite pasteurizado; mini e micro-usinas de beneficiamento; qualidade físico-química e microbiológica; Ribeirão Preto/SP.

¹ Do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto.

² Da Secretária da Agricultura e Abastecimento de São Paulo – Coordenadoria de Defesa Agropecuária – Serviço de Inspeção de São Paulo.

^{1*} 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 – Ramal 22 ou 24.

INTRODUÇÃO

Por sua riqueza de nutrientes, o leite é considerado um alimento quase completo para a raça humana, sendo amplamente comercializado e consumido pela população, especialmente crianças e idosos.

As características físico-químicas do leite podem ser alteradas devido a alguns fatores tais como: nutricionais, ambientais^{14,21}, fraudes do produto, como por exemplo, adição de água^{18,22,24}, dentre outros. A qualidade microbiológica do leite pode ser comprometida devido às condições de higiene durante a ordenha, de limpeza de utensílios e equipamentos antes e após a pasteurização e até mesmo das condições climáticas da região, dentre outros fatores^{10,17}. O leite oferece condições excelentes para a multiplicação de microrganismos, em curto espaço de tempo.

O leite pasteurizado é classificado em tipo A, B, C e Integral²³, de acordo com a sua origem. O leite tipo A é produzido, resfriado, pasteurizado e envasado em granjas leiteiras. O leite tipo B é produzido e resfriado em estábulos leiteiros. O leite tipo Integral é produzido e/ou empacotado em mini e micro-usinas de beneficiamento. O leite tipo C é produzido em fazendas leiteiras. Cada um desses estabelecimentos tem características próprias²³.

As usinas de beneficiamento são os estabelecimentos destinados ao beneficiamento do leite com produção acima de 3000 litros diários. As mini-usinas de beneficiamento são os estabelecimentos que produzem e/ou recebem, beneficiam e empacotam leite até 3000 litros diários. As micro-usinas de beneficiamento são os estabelecimentos que produzem, beneficiam e empacotam até 3000 litros de leite diários²³.

Tratando-se de leite tipo A, B ou C as mini e micro-usinas devem obedecer às normas próprias enquanto para o leite tipo Integral devem seguir os padrões estabelecidos na Resolução SAA-24 de 1 de agosto de 1994 publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo de 2 de agosto de 1994²³ onde consta, inclusive, que as provas microbiológicas e enzimáticas devem ser realizadas periodicamente. O controle diário é exigido apenas para as provas físico-químicas.

Estudos visando avaliar a qualidade do leite pasteurizado vêm sendo realizados em diferentes regiões do Estado de São Paulo^{4,12,22,24}, sendo que os autores têm apontado os principais problemas de qualidade desse produto sem fazer distinção entre o leite proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento e as de maior porte.

Garrido *et al.*¹¹ avaliaram 697 amostras de leite comercializadas na região de Ribeirão Preto/SP e observaram uma maior porcentagem de amostras de leite Integral, de mini e micro-usinas, com qualidade inferior, quando comparado com o tipo B e C, provenientes principalmente de usinas de grande porte, sugerindo a necessidade de uma maior atenção para esse produto.

Esse estudo teve por objetivo verificar as condições microbiológicas e físico-químicas dos leites tipos C, B e Integral produzidos e/ou empacotados por mini e micro-usinas da

região de Ribeirão Preto/SP, avaliando-se inclusive a evolução desta qualidade através da análise de amostras de leite de alguns estabelecimentos que receberam orientação e supervisão durante o período de estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas no período de 1995 a 1998, 390 amostras de leite (123 de leite tipo C, 86 de leite tipo B e 181 de leite tipo Integral) provenientes de dezesseis mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP, sob a fiscalização do Serviço de Inspeção de São Paulo (SISP) ou Serviço de Inspeção Municipal (SIM).

As amostras de leite foram coletadas no comércio ou diretamente nas usinas, sendo transportadas em recipientes térmicos até o laboratório. As temperaturas das amostras na hora da colheita, transporte e recebimento no laboratório foram sempre iguais ou inferiores a 10 °C. A colheita, o recebimento e a análise do leite foram realizados no mesmo dia.

Dentre as mini e micro-usinas beneficiadoras das amostras avaliadas, dez subordinadas ao SISP foram submetidas a um estudo longitudinal, sendo avaliadas 213 amostras de leite no decorrer de 4 anos denominados períodos, ou seja, primeiro período – 1995, segundo período – 1996, terceiro período – 1997 e quarto período – 1998. Estes estabelecimentos foram fiscalizados durante todos esses períodos por um médico veterinário do SISP que, mediante os resultados das análises de leite, orientava os responsáveis pela produção nas usinas.

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas utilizando-se os métodos oficiais exigidos pela legislação vigente^{8,13}: acidez, determinada através do acidímetro de Dornic; densidade a 15 °C determinada pelo termolactodensímetro de Quevenne; gordura pelo butirômetro de Gerber; índice de refração no soro cúprico a 20 °C, através do refratômetro de imersão de Zeiss e prova de peroxidase. Com os resultados dos teores de gordura e densidade, determinou-se o extrato seco total através do Disco de Ackermann. O extrato seco desengordurado foi obtido pela subtração do teor de gordura do extrato seco total.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo o método recomendado pela APHA³: contagem padrão em placas com incubação a 35 ± 1 °C/48 h pelo método de semeadura em profundidade, em agar padrão; determinação quantitativa de bactérias do grupo coliforme pelo método de fermentação em tubos múltiplos (Número Mais Provável) em caldo lactosado-bile-verde brilhante a 2% e incubação a 35 ± 1 °C/48 h; determinação quantitativa de bactérias do grupo coliforme de origem fecal pelo método de fermentação em tubos múltiplos (Número Mais Provável) em caldo *Escherichia coli* a

44,5 ± 0,2 °C/24 h e pesquisa de *Salmonella* sp com algumas modificações em relação à substituição do caldo de pré-enriquecimento por água peptonada 1% tamponada e do meio de identificação presuntiva pelo Rugai modificado (IAL)¹⁹ e a introdução do meio de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e de isolamento agar verde brilhante.

Avaliação da qualidade do leite

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas foram comparados com os valores estabelecidos pela legislação^{5,6,7,23}.

RESULTADOS

A frequência de amostras de leite pasteurizado provenientes de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação em vigor quanto ao exame microbiológico e análises físico-químicas é apresentada na Tabela 1.

Na Tabela 2 estão mostradas as características físico-químicas das amostras estudadas de acordo com o tipo de leite. As análises físico-químicas que com maior frequência apresentam valores inferiores aos mínimos estabelecidos pela legislação foram; em ordem decrescente: índice de refração (85 amostras), acidez (41), extrato seco desengordurado (21), densidade (20), extrato seco total (13) e gordura (5).

Tabela 1. Frequência de amostras de leite pasteurizado de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP em relação à legislação em vigor.

Tipo de leite	De acordo		Em desacordo quanto às análises físico-químicas		Em desacordo no exame microbiológico	
	n	%	n	%	n	%
C (n=123)	69	56,1	19	15,5	40	32,5
B (n=86)	38	44,2	32	37,2	28	32,6
Integral (n=181)	81	44,8	56	30,9	56	31,0

A prova de peroxidase foi negativa em 22 amostras.

A Tabela 3 apresenta a distribuição de microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes fecais nas amostras de leites pasteurizados de mini e micro-usinas.

Não foram encontradas Salmonelas em nenhuma das amostras estudadas.

A Tabela 4 mostra a porcentagem de amostras em desacordo com os padrões estabelecidos para as análises microbiológicas e físico-químicas, durante os quatro anos de avaliação de dez mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As alterações das características físico-químicas ocorreram com maior frequência nas amostras de leite tipo B (37,2%) e no tipo Integral (30,9%), com uma redução para 15,5% no leite tipo C. Essas porcentagens são mais altas do que as encontradas por Garrido *et al.*¹¹ estudando leite tipo B e C provenientes, principalmente, de usinas de maior porte e comercializados na mesma região. Esses autores verificaram que 3% e 4,3% de amostras de leite C e B, respectivamente, estavam em desacordo com os padrões físico-químicos estabelecidos na legislação. Por outro lado, Santos *et al.*²² ao estudarem a qualidade do leite pasteurizado da região de São José do Rio Preto/SP, observaram 25% de amostras com irregularidades quanto às características físico-químicas. Em outros estados do Brasil, estudos realizados nos últimos 6 anos, mostraram que a qualidade físico-química do leite varia muito de uma região para a outra. Padilha *et al.*¹⁸ observaram adição de água em 62,1% de amostras de leite na cidade de Recife/PE. Abreu *et al.*¹ estudando a qualidade do leite C em Lavras/MG, encontraram todas as amostras de acordo com a legislação.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que leites com alterações físico-químicas ocorreram principalmente em relação ao índice de refração no soro cúprico, tendo 21,3% das amostras apresentado valores abaixo do mínimo exigido, o que sugere agugagem ou problemas tecnológicos^{2,22}, como por exemplo, o fato que foi observado pelo fiscal do SISP em uma das

Tabela 2. Características físico-químicas dos leites pasteurizados de mini e micro-usinas tipos C, B e Integral, produzidos e/ou empacotados por mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP.

Análise físico-química	Tipo de leite pasteurizado					
	C (n=123)		B (n=86)		Integral (n=181)	
	Mediana	Faixa-Varição	Mediana	Faixa-Varição	Mediana	Faixa-Varição
Acidez (°D)	16,0	14,0-19,0	15,0	13,0-17,0	15,0	11,0-20,0
Densidade (15 °C)	1,031	1,012-1,033	1,031	1,023-1,033	1,031	1,018-1,036
Gordura (%)	4,4	2,0-5,7	4,5	2,9-7,0	4,5	0,9->7,0
Extr. Seco Total (%)	13,42	9,21-15,19	13,30	11,73-15,56	13,61	10,89-15,46
Extr. Seco Desengordurado (%)	9,01	8,12-9,80	8,92	7,18-9,86	9,03	7,28-12,58
Índ.Refr.Soro Cúprico (°Zeiss)	37,4	35,1-38,7	37,0	35,2-38,2	37,2	32,0-39,0

Tabela 3. Distribuição de microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes fecais nas amostras de leites pasteurizados de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP.

Microrganismos	Tipo de leite pasteurizado					
	C (n=123)		B (n=86)		Integral (n=181)	
	n	%	n	%	n	%
Mesófilos (UFC/ML)						
< 8 x 10 ⁴	122	99,2	86	100	179	98,8
8,1 x 10 ⁴ – 3 x 10 ⁵	0	0	0	0	01	0,6
> 3,1 x 10 ⁵	1	0,8	0	0	01	0,6
Coliformes totais (UFC/mL)						
0 – 4	77	62,6	62	72,1	124	68,5
4,1 – 10	23	18,7	10	11,6	19	10,5
> 10	23	18,7	14	16,3	38	21,0
Coliformes fecais (UFC/mL)						
0 – 1	84	68,3	65	75,6	144	79,5
	1,1 – 2	3,3	02	2,3	03	1,7
	> 2	28,4	19	22,1	34	18,8

Tabela 4. Avaliação longitudinal da qualidade do leite pasteurizado de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP.

Período	Tipo C (n = 99)				Tipo B (n = 81)				Tipo Integral (n = 33)			
	A	D FQ	D M	Total	A	D FQ	D M	Total	A	D FQ	D M	Total
	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	
Primeiro (n = 42)	7 (46,7)	1 (6,7)	7 (46,7)	15	10 (52,6)	2 (10,5)	7 (36,8)	19	5 (62,5)	0	3 (37,5)	8
Segundo (n = 72)	14 (53,8)	5 (19,2)	7 (26,9)	26	10 (35,7)	14 (50,0)	12 (42,8)	28	5 (27,8)	5 (27,8)	10 (55,6)	18
Terceiro (n = 67)	18 (52,9)	5 (14,7)	13 (38,2)	34	12 (46,1)	9 (34,6)	8 (30,8)	26	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)	7
Quarto (n = 32)	12 (50,0)	6 (25,0)	9 (37,5)	24	4 (50,0)	4 (50,0)	0	8	0	0	0	0

A, de acordo com a legislação em vigor; D, em desacordo com a legislação em vigor; FQ, análise físico-química; M, exame microbiológico.

usinas estudadas, ou seja, após a higienização do pasteurizador a água não era completamente escurrida, misturando – se com o leite. A prova de peroxidase negativa, cuja frequência foi alta em muitos estudos^{9,20,22}, ocorreu em apenas 5,1% das amostras.

Quanto à qualidade microbiológica pode – se observar que a porcentagem de amostras em desacordo com a legislação foi similar para os três tipos de leites provenientes de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP, ou seja, 32,5%, 32,6% e 31,0%, para o leite tipo C, B e Integral, respectivamente. Esses índices são superiores aos 11,3% para leite C e 19,1% para leite B observados por Garrido *et al.*¹¹ em leites provenientes principalmente de usinas de maior porte (fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Federal – SIF) e comercializados na mesma região.

Nader Filho *et al.*¹⁵ ao avaliarem a qualidade microbiológica de amostras de leite pasteurizado tipos B e C coletadas de usinas do Estado de São Paulo subordinadas ao SIF, obser-

varam que 18,75% e 41,25%, respectivamente, estavam em desacordo com os padrões estabelecidos na legislação.

Santos *et al.*²², de um total de 511 amostras de leites comercializadas em São José do Rio Preto/SP encontraram 25% com microrganismos mesófilos e/ou coliformes totais e/ou coliformes fecais acima do tolerado.

A contaminação do leite pode ocorrer em diversas etapas de produção tais como ordenha e processamento. Portanto, a orientação adequada e a conscientização do responsável pela usina são de total importância para obtenção de um produto de boa qualidade. Nader Filho *et al.*¹⁶ realizaram análises microbiológicas em 140 amostras de leite pasteurizado tipo Integral e observaram que o percentual fora dos padrões microbiológicos variou de zero (em uma mini-usina subordinada ao SISP) a 50% (em uma mini-usina subordinada ao SIM).

A avaliação da qualidade físico-química e microbiológica das amostras de leite provenientes das dez mini e micro-usinas estudadas durante 4 anos consecutivos (Tabela 4) revelou que

a qualidade microbiológica do leite tipo B apresentou uma melhora a partir do terceiro período de estudo; o do tipo Integral também no terceiro período, porém no quarto período as usinas estudadas já não produziam mais este tipo de leite. O tipo C apresentou uma maior redução na porcentagem de amostras em

desacordo no segundo período e depois manteve níveis um pouco mais altos no decorrer do estudo. Os dados mostraram que a fiscalização e orientação resultaram em uma maior adequação nas condições higiênico-sanitárias do leite. O mesmo não foi observado em relação às características físico-químicas.

RIALA6/906

Garrido, N.S. *et al.* Physicochemical and microbiological quality evaluation of the pasteurized milk processed by mini and microprocessing plants of the area of Ribeirão Preto, State of São Paulo – Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):141-146, 2001.

ABSTRACT. The objective of this research was to investigate the physicochemical and microbiological quality of pasteurized milk processed by mini and microprocessing plants of the area of Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. The total of 390 samples of pasteurized milk types C, B and whole were analyzed for their physicochemical and microbiological conditions. Ten of this mini and microprocessing plants were submitted a longitudinal study, and their milk samples were analyzed during four years. These factories were supervised by a veterinary of the Agricultural Secretary of São Paulo State who guided each responsible for factory about the results of the milk analyses. The microbiological analysis showed that 32.5% of 123 samples of type C milk, 32.6% of 86 samples of type B milk and 31.0% of 181 samples of whole milk did not comply with the legal standards established by the Brazilian legislation. By the physicochemical analysis 15.5%, 37.2% e 30.9%, respectively, did not comply with legal standards in Brazil. *Salmonella* were negative in all samples. The evaluation of ten mini and microprocessing plants showed that the microbiological quality of the type B milk has a improved in the last two years, the type C milk showed an improvement only in the second year of the study and the type whole milk showed a significant improvement in the third period of study. The results of this study showed that the inspection and guidance resulted in improvement of the sanitary-hygienic quality of these products.

KEY WORDS. Pasteurized milk; mini and microprocessing plants; physicochemical and microbiological quality; Ribeirão Preto/SP; Brazil.

REFERÊNCIAS

1. Abreu, L.R.; Carvalho E.P.; Souza Netto A.C.M. Avaliação de alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite pasteurizado comercializado na cidade de Lavras, no ano de 1994. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, 50(294):3-8, 1995.
2. Alais C. **Ciência de la leche**. Principios de técnica lechera. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.; 1985. 873p.
3. American Public Health Association. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**, 3rd ed., Washington, D.C.: C. Vanderzant & D.F. Splittstoesser; 1992. 1219p.
4. Baruffaldi, R. *et al.* Condições higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipo “B” vendido na cidade de São Paulo/SP, no período de fevereiro a agosto de 1982. **Rev. Saúde Pública**, 18(5):367-74, 1984.
5. Brasil. Leis, decretos, etc... Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (aprovado pelo Decreto 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos 1.255 de 25 de junho de 1962, 1.236 de 2 de setembro de 1994, 1.812 de 8 de fevereiro de 1996 e 2.244 de 4 de junho de 1997). Brasília, Ministério da Agricultura, 1997. p.128-30.
6. Brasil. Leis, decretos, etc... Portaria nº 8 de 26 de junho de 1984 da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria Nacional de Inspeção de Produto Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 jul. 1984. Seção 1, p.1084-6.
7. Brasil. Leis, decretos, etc... Portaria nº 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**, Brasília, 2 jul. 1998, Seção 1, p.4.
8. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – métodos físicos e químicos, Brasília: LANARA, 1981. p.XIV 1-22.
9. Campos, G. *et al.* Avaliação físico-química de leites comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte em 1994. In: **Congresso Nacional de Laticínios**, 13., Minas Gerais, 1995. **Anais**. Minas Gerais, CEPE/ILCT, 1995. p.161-2.
10. Froeder, E.; Pinheiro, A.J.R.; Brandão, S.C.C. Variação da qualidade microbiológica de leite cru tipo “C” da Região de Viçosa. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, 40(241):55-68, 1985.
11. Garrido, N.S. *et al.* Condições físico-químicas e higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipo “C”, “B” e “integral” comercializados na Região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(2): 65 – 70, 1996.
12. Hoffmann, F.L.; Cruz, C.H.G.; Vinturim, T.M. Estudo higiênico-sanitário do leite tipo “B” comercializado na Região de São José do Rio Preto/SP. **Hig. Alim.**, 9(37):24-7, 1995.

Garrido, N.S. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):141-146, 2001.

13. Instituto Adolfo Lutz – **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, p.198-207.
14. Loganatham, S.; Thompson, N.R. Composition of cow's milk I. Environmental and managerial influences. **J. Dairy Sci.**, 51(12):1928-32, 1968.
15. Nader Filho, A. *et al.* Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos B e C processado por algumas usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Hig. Alim.**, 10(43):30-3, 1996.
16. Nader Filho, A. *et al.* Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo "integral", processado por algumas mini e micro-usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Hig. Alim.**, 11(50):21-3, 1997.
17. Oliveira, J.S. Qualidade microbiológica do leite. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, 31(186):15-20, 1976.
18. Padilha, M.R.F.; Fernandez, Z.F.; Padilha, M.R.F. Avaliação higiênico-sanitária do leite tipo "C" comercializado no Recife/PE. **Hig. Alim.**, 13(61):105-9, 1999.
19. Pessôa, G.V.A.; Silva, E.A.M. Milieu pour l'identification présumptive rapide des enterobactéries, des aëromonas et des vibriens. **Ann. Microbiol.**, 125:341-7, 1974.
20. Rolim, H.M.V. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizado comercializado em Goiânia/GO. In: **Congresso Nacional de Laticínios**, 13., Minas Gerais, 1995. **Anais**. Minas Gerais, CEPE/ILCT, 1995. p. 61-4.
21. Santos, E.C.; Xavier, A.T.V.; Passos, L.A.S. Aparente deflexão sazonal de alguns constituintes do leite no início da primavera. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, 36(215):09-15, 1981.
22. Santos, C.C.M. *et al.* O. Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado e comercializado na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1):85-9, 1999.
23. São Paulo (Estado). Leis, decretos, etc... Resolução SAA – 24 de 1 de agosto de 1994. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 2 ago. 1994. Seção 1, p.18-32.
24. Silveira, N.V.V. *et al.* Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 49(1):19-25, 1989.

Recebido em 16/05/2001; Aprovado em 07/03/2002

Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida

Aflatoxin M₁ in soft and parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography

Guilherme PRADO¹
Marize S. de OLIVEIRA¹
Eliana P. de CARVALHO²
Thaís VELOSO¹
Leandro A. F. de SOUSA³
Ana Cristina F. CARDOSO³

RIALA6/907

Prado, G. *et al.* Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):147-151, 2001.

RESUMO: Produtos derivados de leite, como o queijo, podem estar contaminados com aflatoxina M₁ (AFM₁) quando o gado leiteiro consome ração contendo aflatoxina B₁ (AFB₁). Amostras de queijo tipo prato e tipo parmesão ralado foram coletadas na cidade de Belo Horizonte pela Vigilância Sanitária de Minas Gerais – Brasil. Foi obtido um extrato purificado através de extração com diclorometano, seguido de lavagem com n-hexano e purificação em coluna de imunoafinidade. A quantificação da AFM₁ foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando detector de fluorescência. AFM₁ foi detectada em todas as marcas de queijo tipo prato analisadas, em uma faixa de concentração de 0,02 a 0,54 ng/g e média de 0,15 ng/g. Em queijo ralado, tipo parmesão, AFM₁ foi detectada em 13 das 14 marcas de amostras analisadas (93%), em faixa de concentração de 0,04 a 0,30 ng/g e média de 0,14 ng/g.

PALAVRAS-CHAVE. queijo; aflatoxina M₁; coluna de imunoafinidade; CLAE.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que contaminam as culturas no campo e durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica^{22,32}.

Mamíferos que ingerem produtos contaminados com aflatoxina B₁ (AFB₁) excretam pequenas quantidades de aflatoxina M₁ (AFM₁) no leite. Dessa forma, a população pode estar indiretamente exposta a aflatoxina pela ingestão de leite, queijo, carne e ovos, de pessoas e/ou animais que consumiram produtos contaminados^{2,4,6,10,11,15,17,18,20,23,24,26,31}. Alguns relatos da literatura descrevem, inclusive, níveis elevados de AFM₁ em leite materno de populações que ingeriram alimentos contaminados^{8,22,33}.

¹ Fundação Ezequiel Dias – Núcleo de Micologia e Micotoxinas – Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – Gameleira- Belo Horizonte/MG 30510-010 – gui@fined.mg.gov.br

² Universidade Federal de Lavras/MG. Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Departamento de Ciência dos Alimentos. Caixa Postal 37. 37200-00. Lavras/MG

³ Bolsistas do CNPq

Recentemente AFM₁ foi classificada na classe 2 B: provável carcinógeno humano, tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado à redução dos níveis de AFM₁ ao mínimo, de modo a minimizar o risco potencial, desde que não há suficiente informação para estabelecer um nível de exposição razoável^{16,25,32}.

Em relação ao queijo, a presença de aflatoxina pode ser fundamentalmente devido a três causas: (1) presença de AFM₁ no leite com o qual queijos são elaborados, como consequência de alimentos contaminados com AFB₁ e ingeridos pelo gado leiteiro; (2) síntese de aflatoxinas por fungos que crescem em queijos e (3) o uso de leite de pó com AFM₁ utilizado na elaboração de queijo¹⁶.

Quimicamente, a presença de AFM₁ no queijo pode ser devido por um lado, ao fato da toxina se ligar à caseína^{13,18}, e por outro lado, que parte do soro do leite permanece preso ao coalho. López *et al.*¹⁶ verificaram em uma pequena produção de queijo, a partir de leite artificialmente contaminado com AFM₁, que 60% da AFM₁ se encontrava no soro e 40% no queijo.

Alguns países têm estabelecido níveis de tolerância máxima para AFM₁ em queijo: 0,20-0,25 ng/g⁹. No Brasil, ainda não foi estabelecida nenhuma regulamentação para AFM₁ em queijo.

Uma vez que a pasteurização do leite ou processamento do queijo não destrói completamente a AFM₁, é prudente que se verifique a incidência de AFM₁ nesse alimento^{1,12,13,16}. Deve-se ressaltar que estes produtos são consumidos largamente por crianças, que são consideradas mais susceptíveis aos efeitos adversos das micotoxinas²⁸.

Visto que no Brasil não existem relatos da incidência de aflatoxina M₁ em queijo tipo prato e tipo parmesão ralado, o objetivo deste trabalho foi verificar os níveis de AFM₁ nesses produtos consumidos em Belo Horizonte/MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas amostras de 9 marcas de queijo tipo prato e 14 de queijo tipo parmesão ralado, coletadas no período de agosto/2000 a fevereiro/2001 pelo Serviço de Vigilância Sanitária/MG, representando cerca da totalidade das marcas oferecidas no comércio de Belo Horizonte/MG. A quantidade coletada variou de 1 a 2 kg, sendo que as amostras foram homogeneizadas em liquidificador por 2 minutos e acondicionadas em freezer a -20 °C até o momento da análise.

Extração e quantificação de AFM₁

O método utilizado para a extração da AFM₁ em queijo foi o descrito por Dragacci *et al.*⁷, onde em 10 g de amostra foi efetuada uma extração com diclorometano seguido de uma partição com n-hexano. A purificação do extrato foi executada em coluna de imunoafinidade (Vicam Inc. USA) como recomendado por Tuinstra *et al.*²⁹, sendo o extrato final dissolvido

em 1000 µL da fase móvel de injeção água:acetonitrila (30:70), agitado no ultra-som por 30 segundos e filtrado através de filtro de 0,45 µm.

A separação e a quantificação da AFM₁ foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu com detector de fluorescência (excitação: 366 nm e emissão: 428 nm) e com coluna Shim – pack CLC – ODS C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim – pack G – ODS, 5 µm, 4 x 10 mm. A coluna foi eluída isocriticamente com água:isopropanol:acetonitrila (80:12:8) a um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 100 µL. Nessas condições o tempo de retenção foi aproximadamente 10,3 minutos. Todos os solventes utilizados foram os recomendados para cromatografia líquida e a água purificada pelo sistema de ultrafiltração (MILLI – Q). Durante toda a análise foi borbulhado gás hélio na fase móvel. Para quantificação da AFM₁ foi utilizada uma curva de calibração como descrito por Prado *et al.*²⁰. A partir do cálculo da área do pico da AFM₁ do extrato da amostra e das soluções padrões foi calculado o teor de AFM₁ na amostra. Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustra a alta seletividade da limpeza através da utilização de coluna de imunoafinidade, onde não se observa interferentes próximos ao tempo de retenção da AFM₁.

Os valores de recuperação após contaminação com 0,1 e 0,3 ng/g de AFM₁ foram 80,0% e 78,9%, respectivamente. Dragacci *et al.*⁷ encontraram em amostras contaminadas com 0,2 e 0,8 ng/g, recuperações na faixa de 72,0 a 87,6% e 71,4 a 81,0%, respectivamente. Os coeficientes de variação encontrados foram 25,0% e 8,3%, para amostras fortificadas com 0,1 e 0,3 ng/g de AFM₁, respectivamente. A linearidade da curva padrão de calibração (0,03 a 0,6 ng/g de AFM₁) foi superior a 0,99 nas condições experimentais desenvolvidas.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados de AFM₁ obtidos em queijo tipo prato e tipo parmesão ralado. Observa-se que em todas as amostras de queijo tipo prato foi detectada AFM₁ em uma faixa de 0,02 a 0,54 ng/g e média de 0,15 ng/g. Duas das amostras (22%) apresentaram valores de AFM₁ superiores a 0,2 ng/g, que é o nível máximo tolerado em queijo na Holanda^{9,30}. Em queijo tipo parmesão ralado os níveis de AFM₁ variaram de 0,04 a 0,30 ng/g e média entre os valores positivos de 0,14 ng/g. Em 4 amostras (29%) os níveis de AFM₁ foram superiores a 0,2 ng/g. Os valores de coeficientes de variação em todas as repetições foram inferiores a 30%, que é o recomendado para análise de micotoxinas¹⁴.

No Brasil, poucos trabalhos relatam a presença de AFM₁ em queijo. Sylos *et al.*²⁸, não detectaram AFM₁ em 36 amostras (12 marcas) nos tipos Minas, Mussarela e Cheddar. Entretanto, a metodologia utilizada foi à cromatografia em camada delgada com quantificação visual baseada na intensidade de fluorescência, técnica de menor sensibilidade,

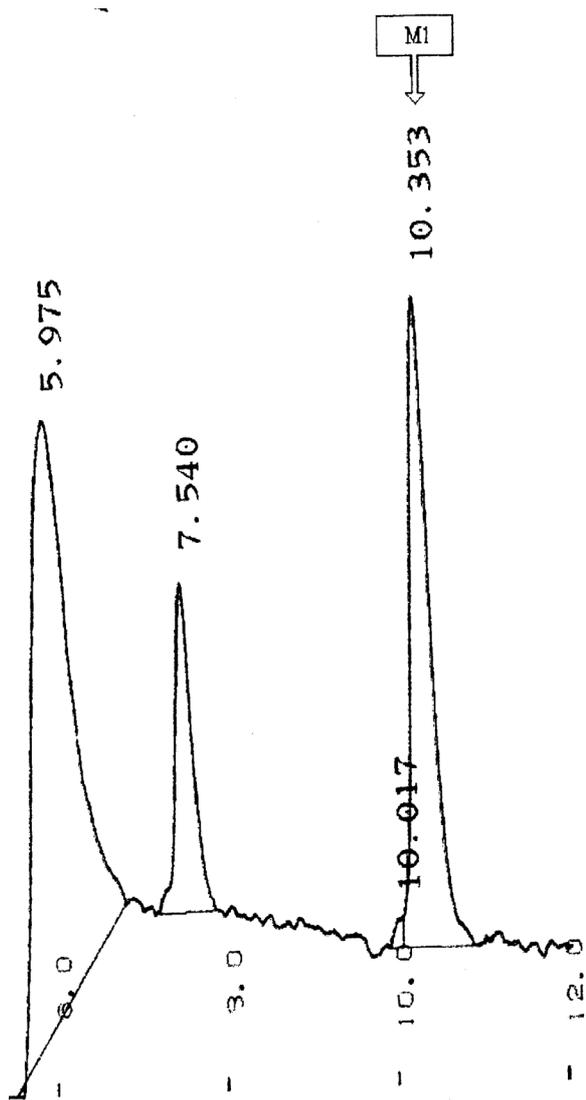


Figura 1. Cromatograma obtido por CLAE em queijo prato naturalmente contaminado (0,18 ng/g).

especificidade e precisão quando comparado a CLAE²⁷. Prado *et al.*²¹ verificaram a ocorrência de AFM₁ em 75 amostras de queijo Minas (frescal, canastra e padrão) e em 56 (74,7%), a AFM₁ foi detectada em uma faixa de 0,02 a 6,92 ng/g, utilizando coluna de imunoafinidade como etapa de purificação e CLAE como técnica de separação e quantificação. Na Itália, um total de 223 amostras de queijo fabricadas no período de 1991-1994 foram analisadas para AFM₁. A maior parte das amostras (91%) estava na faixa de 5-100 ng/kg e somente 1 (0,5%) apresentou AFM₁ com valor superior a 250 ng/kg¹⁸. Barbieri *et al.*³ verificaram a ocorrência de AFM₁ em queijo parmesão em Modena, Itália, em 1991, e em somente 18 amostras foi detectado AFM₁ em baixas concentrações: faixa de 0,035 a 0,19 ng/g. Resultados idênticos foram obtidos por Dragacci e Fremy⁵ em um monitoramento na França, no período de 1990 a 1995, em vários tipos de queijo. Somente 3 amostras apre-

Tabela 1. Ocorrência de AFM₁ em queijo tipo prato.

Marca	Níveis de AFM ₁ (ng/g)*	Coefficiente de Variação (%)
A	0,04	19,0
B	0,26	1,3
C	0,07	20,0
D	0,54	0
E	0,18	4,0
F	0,08	25,0
G	0,09	8,0
H	0,02	0
I	0,04	13,0
Média	0,15	

* Média de Triplicata

Limite de Detecção: 0,01 ng/g

Limite de Quantificação: 0,02 ng/g

Tabela 2. Ocorrência de AFM₁ em queijo ralado tipo parmesão.

Marca	Níveis de AFM ₁ (ng/g)*	Coefficiente de Variação (%)
1	0,25	7,0
2	0,26	6,0
3	0,08	9,0
4	0,28	10,0
5	0,05	16,0
6	0,30	10,0
7	0,05	14,0
8	0,04	30,0
9	0,11	13,0
10	0,08	8,0
11	0,15	10,0
12	ND	-
13	0,12	5,0
14	0,10	7,0
Média	0,14	

* Média de triplicata

ND - Não Detectado

Limite de Detecção: 0,01 ng/g

Limite de Quantificação: 0,02 ng/g

sentaram AFM₁ com valor superior a 0,2 ng/g. Da mesma forma, Piva *et al.*¹⁹ avaliaram em 1984, queijos da França, Alemanha e Dinamarca e detectaram AFM₁ em 19,5%, 26,5% e 53,5% das amostras analisadas, respectivamente, mas somente em 2 amostras da França o valor de AFM₁ excedia 0,25 ng/g. Entretanto, Barrios *et al.*⁴ no sul da Espanha, em 1995, verificaram a presença de AFM₁ em 16 das 35 amostras (45,7%) em concentrações entre 20 e 200 ng/g.

Apesar da incidência de AFM₁ em queijo tipo prato e ralado tipo parmesão ter sido elevada: presença em 22 das 23 amostras analisadas, os níveis médios registrados, 0,15 ng/g e 0,14 ng/g, respectivamente, estão dentro dos níveis de tole-

rância máxima para AFM₁ em queijo, exigida em outros países: 0,20-0,25 ng/g⁹.

ser considerada um sério problema de saúde pública. Entretanto, mais amostras devem ser analisadas em um período maior de tempo para verificar a tendência observada neste trabalho.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que atualmente, em amostras de queijo tipo prato e ralado tipo parmesão coletadas no comércio de Belo Horizonte/MG, a contaminação com AFM₁ não pode

AGRADECIMENTOS

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

RIALA6/907

Prado, G. *et al.* Aflatoxin M₁ in soft and parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):147-151, 2001.

ABSTRACT. Aflatoxin M₁ was determined in Soft and Parmesan cheese by immunoaffinity column and liquid chromatography. Milk products such as cheese may be contaminated by aflatoxin M₁ (AFM₁) when dairy cattle have consumed feeds contaminated with aflatoxin B₁ (AFB₁). Samples of Soft and Parmesan cheese were collected in Belo Horizonte city, by the Inspection Service of Minas Gerais – Brazil. A purified extract was obtained by extraction with dichloromethane followed by a washing with n-hexane and immunoaffinity column clean-up. The quantification of AFM₁ was done by high performance liquid chromatography (HPLC) using a fluorescence detector. AFM₁ was detected in all soft cheese brands analysed, in concentrations ranging between 0.02 and 0.54 ng/g and mean level of 0.15 ng/g. In grated cheese, Parmesan variety, AFM₁ was detected in 13 of 14 brands analysed (93%), in the range 0.04-0.30 ng/g with mean level of 0.14 ng/g.

KEY WORDS. Cheese; aflatoxin M₁; immunoaffinity column; HPLC.

REFERÊNCIAS

1. Bakirci, I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, 12:47-51, 2001.
2. Baldissera, M.A. *et al.* Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações para consumo animal no sul do Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 12:77-82, 1992.
3. Barbieri, G. *et al.* Aflatoxin M₁ in Parmesan cheese: HPLC determination. **J. Food Sci.**, 59:1313-1331, 1994.
4. Barrios, M.J. *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses from the south of Spain. **J. Food Prot.**, 59:898-900, 1996.
5. Dragacci, S.; Fremy, J.M. Application of immunoaffinity column cleanup to aflatoxin M₁ determination and survey in cheese. **J. Food Prot.**, 59:1011-1013, 1996.
6. Dragacci, S.; Fremy, J.M. Contamination du lait par l'aflatoxine M₁. Résultats de quinze années de surveillance. **Sci. Aliments.**, 13:711-722, 1993.
7. Dragacci, S. *et al.* Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. **Food Addit. Contam.**, 12:59-65, 1995.
8. El-Nezami, H.S. *et al.* Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food Chem. Toxicol.**, 33:173-179, 1995.
9. FAO (Food and Agricultural Organization of The United Nations). **Worldwide regulations for mycotoxins.** 1995. **A compendium.** n.64, 45p. Rome, 1996.
10. Fernandes Oliveira, C.A. *et al.* Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 14:7-10, 1997.
11. Fonseca, H.; Del Nery, H.; Silveira Filho, S. Teor de aflatoxina M₁ no leite de vacas alimentadas com farelo de amendoim tóxico. **O solo**, 66: 33-40, 1974.
12. Galvano, F.; Galofaro, V.; Galvano, G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products; a worldwide review. **J. Food Prot.**, 59:1079-1090, 1996.
13. Hassanin, N.I. Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of yoghurt-cheese and acidified milk. **J. Sci. Food Agric.**, 65:31-34, 1994.
14. Horwitz, W.; Albert, R. The reliability of aflatoxin assays. **Quart. Bull. Assoc. Food and Drug Off. United States**, 46:14-24, 1982.
15. Karaiannoglou, P.; *et al.* Triantafyllou, J. **Milchwissenschaft**, 44:746-748, 1989.
16. López, C. *et al.* Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **Int J. Food Microbiol.**, 64:211-215, 2001.
17. López-Díaz, T.M. *et al.* Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. **Int. J. Food Microbiol.**, 30:391-395, 1996.
18. Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Bertuzzi, P.; Piva, G. Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese. **Food Addit. Contam.**, 14:341-344, 1997.
19. Piva, G.; Pietri, A.; Galazzi, L.; Curto, O. Aflatoxin M₁ in occurrence in dairy products marketed in Italy. **Food Addit. Contam.**, 5:133-139, 1987.
20. Prado, G. *et al.* Ocorrência de aflatoxina M₁ em Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – agosto/98 a abril/99. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 19:420-423, 1999.
21. Prado, G. *et al.* Aflatoxin M₁ in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/Brazil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 20:398-400, 2000.

22. Saad, A.M.; Abdelgadir, A.M.; Moss, M.O. Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mothers breast milk in Abu Dhabi, UAE. **Food Addit. Contam.**, 12:255-261, 1995.
23. Sabino, M.; Purchio, A.; Zorzetto, M.A.P. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 6:312-326, 1989.
24. Saitanu, K. Incidence of aflatoxin M₁ in Thai milk products. **J. Food Prot.**, 60:1010-1012, 1997.
25. Smith, J.E. *et al.* Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Nat. Toxins**, 3:187-192, 1995.
26. Souza, S.V.C.; Vargas, E.A.; Junqueira, R.G. Eficiência de um *kit* de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 19:401-405, 1999.
27. Sylos, C.M.; Amaya, D.R. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56:87-97, 1996.
28. Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Carvalho, P.R.N. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 13:169-172, 1996.
29. Tuinstra, L.G.M.; Roos, A.H.; Van Trup, J.M.P. Liquid chromatography determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **J.A.O.C. Int.**, 76:1248-1254, 1993.
30. Van Egmond, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. **Food Addit. Contam.**, 6:139-188, 1989.
31. Veldman, A. *et al.* Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. **Anim. Prod.**, 55:163-168, 1992.
32. WHO (World Health Organization). **Mycotoxins**. Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127p.(Environmental Health Criteria 11).
33. Zarba, A. *et al.* Aflatoxin M₁ in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. **Carcinog.**, 13:891-894, 1992.

Recebido em 04/09/2001; Aprovado em 26/03/2002

Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP

Occurrence of aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of São José do Rio Preto/SP

Cecília C.M. dos SANTOS^{1*}
Maria do Rosário Vigeta LOPES¹
Sandra Y. KOSSEKI¹

RIALA6/908

Santos, C.C.M. dos; Lopes, M. do R.V. e Kosseki, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(2):153-157, 2001.

RESUMO. O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoim e produtos de amendoim comercializados na Região de São José do Rio Preto/SP. Foram analisadas, no período de agosto de 1996 a dezembro de 2000, 178 amostras, sendo 77 de amendoim cru, 31 pés-de-moleque, 48 paçocas e 22 de outros produtos de amendoim (amendoim confeitado doce e salgado e torrão). As amostras foram coletadas aleatoriamente, pelo Grupo de Vigilância Sanitária da Direção Regional de Saúde (DIRXXII) no comércio varejista de São José do Rio Preto/SP e Região. A quantificação das aflatoxinas B₁ e G₁, foi realizada pelo método de Soares & Rodriguez-Amaya, sendo que o limite de quantificação do método (B₁ + G₁) conseguido em nosso laboratório, foi de 5,0 µg/kg. Das 77 amostras de amendoim cru analisadas, 24 (13,5%) apresentaram teor de contaminação por B₁ + G₁ maior que 30 µg/kg (limite estabelecido pelo Ministério da Saúde), 04 (2,2%) menor ou igual a 30 µg/kg e 49 (27,5%) foi inferior a 5,0 µg/kg. Para as amostras de pé de moleque, 13 (7,3%) apresentaram contaminação por aflatoxinas B₁ + G₁ acima de 30 µg/kg, 02 (1,1%) menor ou igual a 30 µg/kg e 16 (9,0%) inferior a 5,0 µg/kg. Já para as amostras de paçoca, 14 (7,9%) continham teores acima de 30 µg/kg, 02 (1,1%) menor ou igual a 30 µg/kg e 32 (18%) inferior a 5,0 µg/kg. Para os demais produtos de amendoim, 08 (4,5%) apresentaram contaminação acima de 30 µg/kg, 03 (1,7%) menor ou igual a 30 µg/kg e 11 (6,2%) inferior a 5,0 µg/kg. De acordo com os resultados deste estudo, pode-se observar, que a porcentagem de amostras contaminadas com aflatoxina manteve-se em torno de 39,3%, mostrando que as investigações sobre a ocorrência de aflatoxinas em alimentos são de grande importância para o desenvolvimento de ações de controle de produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação.

PALAVRAS-CHAVES. Aflatoxinas; Amendoim; Produtos de Amendoim, ocorrência.

INTRODUÇÃO

Certas doenças transmitidas por alimentos podem ser causadas pela presença de micotoxinas, que são substâncias

metabólicas tóxicas produzidas por algumas linhagens fúngicas que crescem sob condições favoráveis em grande variedade de substratos, principalmente os grãos^{2,10}. Os alimentos frequentemente podem ser contaminados com fungos durante

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

* Endereço para correspondência: R. Alberto Sufredini, 2335 – São José do Rio Preto/SP – Tel: (17) 224-2602 (R. 25).

a colheita, estocagem, manuseio e transporte antes de chegarem ao consumidor^{8,9,23}.

A presença de micotoxinas em produtos alimentícios depende do crescimento de espécies fúngicas específicas e de fatores como umidade relativa do ar entre 80 e 90% e temperatura ambiental superior a 20 °C^{2,5}. Sendo o Brasil um país de clima tropical, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento destas micotoxinas. Produtos agrícolas, como o amendoim, requerem clima quente e úmido para o plantio e desenvolvimento¹⁶.

Atualmente existem várias micotoxinas conhecidas, com respectiva indicação dos fungos produtores e dos efeitos patológicos produzidos¹⁷. As aflatoxinas, produzidas principalmente pelo *A. flavus* e *A. parasiticus*¹², são os metabólitos fúngicos mais extensivamente estudados, sendo a aflatoxina B₁ (AFB₁) o mais potente carcinogênico conhecido⁶, apresentando ainda propriedades teratogênicas e mutagênicas^{6,13,33}.

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, são as principais, com estruturas químicas semelhantes^{24,33}.

A ocorrência das aflatoxinas é maior em sementes oleaginosas, que reúnem características e condições preferenciais para o desenvolvimento de fungos^{8,23,27}.

A região de São José do Rio Preto/SP, possui condições climáticas que favorecem o crescimento de fungos, tem características agropecuárias e, destina em média 0,1 a 20 hectares de terra para o cultivo do amendoim, embora, esta não seja a cultura predominante na região^{27, 29}.

A fiscalização associada ao conhecimento técnico do produtor e a observância de normas e critérios antes e depois da colheita, assim como no armazenamento do produto, são indispensáveis para eliminar as condições favoráveis para o crescimento dos fungos, evitando a contaminação por aflatoxina.

Em 1994, o Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde – SP normatizou um programa de coleta de amostras, devido a importância em saúde pública, do monitoramento das micotoxinas^{5,28}.

As freqüentes reportagens, nos jornais da região de São José do Rio Preto/SP, notificando a apreensão, por parte da Vigilância Sanitária, para averiguação de lotes de amendoins e produtos contendo amendoim, com suspeita de estarem contaminados com aflatoxinas^{7,21}, vem conferir relevância ao trabalho de monitoramento de amendoins e derivados, o qual já vem sendo realizado desde 1996.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência dos níveis de contaminação, resultantes das dosagens de aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim cru e em produtos a base de amendoim.

MATERIAL E MÉTODOS

Material: Amostras

As 77 amostras de amendoim cru e as 101 amostras de produtos de amendoim, conhecidos como: paçoca, pé-de-mo-

leque, amendoim confeitado doce e salgado, paçoca de rolha e torrão, totalizando 178 amostras de diferentes marcas e procedências, foram coletadas aleatoriamente no comércio varejista de São José do Rio Preto/SP. e região, a cargo da Vigilância Sanitária, em amostras representativas de 1 kg.

Método: Extração

Aproximadamente 500 g de cada amostra foram triturados, utilizando liquidificador comum e 50 g foram retirados para análise.

As aflatoxinas B₁ e G₁ foram separadas usando a técnica de cromatografia em camada delgada como descrito por Soares & Rodriguez-Amaya³².

O método estabelece extração das toxinas de 50 g de amostra com solução de metanol com KCl 4% (9:1) e limpeza do extrato com solução de sulfato de cobre 10%, seguido por duas partições com clorofórmio.

O extrato é seco e ressuspenso em 500 µL de clorofórmio imediatamente antes da aplicação na camada delgada de sílica.

Deteção e Quantificação

A separação foi feita por cromatografia em camada delgada de sílica gel e a quantificação por comparação visual da intensidade de fluorescência com a do padrão sob luz ultravioleta.

Cerca de 5,0 µL de extrato foi aplicado na placa cromatográfica juntamente com diferentes concentrações de padrão de AFB₁ e AFG₁. A placa foi desenvolvida em clorofórmio-acetona (9:1)^{5,25,32}.

As concentrações dos padrões e a identidade das aflatoxinas foram determinados conforme as técnicas descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC – 970.44 49.2.02)¹.

No método original³², os autores obtiveram um limite de detecção de 2 mg/kg, porém, em nosso laboratório o limite de quantificação do método (B₁ + G₁) conseguido foi de 5 mg/kg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as 178 amostras analisadas revelaram que 59 (33,2%) apresentaram contaminação por aflatoxinas (B₁ + G₁) superior a 30 µg/kg, limite máximo tolerado pelo Ministério da Saúde³ (Tabela 1). Do total das amostras analisadas, 70 (39,3%) apresentaram contaminação por aflatoxinas.

A Resolução GMC n° 56/94 MERCOSUL, estabelece os Limites Máximos Tolerados de aflatoxinas em alguns alimentos, incluindo o amendoim, preconizando 20 µg/kg (B₁ + B₂ + G₁ + G₂)²². O Ministério da Agricultura já internalizou esta Resolução através da Portaria n° 183 de 21 de março de 1996^{15,34}, enquanto o Ministério da Saúde não. Se for considerado este limite, o número de amostras que estariam impróprias para consumo seria de 63 (35,3%).

Os riscos potenciais à saúde pública em decorrência da ingestão desta toxina justificaria o mesmo procedimento por parte do Ministério da Saúde.

O efeito crônico resultante da ingestão freqüente de pequenas doses desta toxina e o índice elevado de contaminação, revelado pelos resultados obtidos neste estudo, constituiu um fato preocupante do ponto de vista sanitário, pois, o conhecimento destes parâmetros, bem como o potencial de riscos e da-

nos pertinentes, estabelecem o principal instrumento de análise e planejamento da ação da Vigilância Sanitária, previstos na Portaria nº 1.248/GM de 26/11/1993 do Ministério da Saúde⁴.

Outros estudos publicados também relatam a ocorrência de aflatoxina em cerca de 40% das amostras de produtos brasileiros de amendoim^{19,20,24,26,30}.

Sabe-se que os derivados de amendoim como a paçoca e o pé-de-moleque são consumidos em grande quantidade pela

Tabela 1. Ocorrência de aflatoxinas (B₁ + G₁), em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP no período de agosto/1996 a dezembro/2000.

Tipos de Produtos	Número de Amostras	(B ₁ + G ₁) >20µg/kg	(B ₁ + G ₁) >30µg/kg	(B ₁ + G ₁) <30µg/kg	<5,0µg/kg	Amostras Positivas
Amendoim	77 (43,3%)	25 (14,0%)	24 (13,5%)	04 (2,2%)	49 (27,5%)	28 (15,7%)
Pé de Moleque	31 (17,4%)	14 (7,9%)	13 (7,3%)	02 (1,1%)	16 (9,0%)	15 (8,4%)
Paçoca	48 (27,0%)	15 (8,4%)	14 (7,9%)	02 (1,1%)	32 (18,0%)	16 (9,0%)
Outros	22(12,3%)	09 (5,0%)	08(4,5%)	03 (1,7%)	11 (6,2%)	11 (6,2%)
Total	178 (100%)	63 (35,3%)	59 (33,2%)	11 (6,1%)	108 (60,7%)	70 (39,3%)

Tabela 2. Distribuição anual da variação dos níveis de aflatoxina (B₁ + G₁) em amostras de amendoim e produtos de amendoim – agosto/96 a dezembro/00.

Ano	Níveis de aflatoxinas (mg/kg)						Total
	<5	5 a 20	21 a 30	31 a 100	101 a 300	301 a 1255	
1996	07 (3,9%)	—	—	03 (1,7%)	09 (5,1%)	—	19 (10,7%)
1997	19 (10,7%)	05 (2,8%)	—	06 (3,4%)	08 (4,5%)	02 (1,1%)	40 (22,5%)
1998	20 (11,2%)	02 (1,1%)	—	04 (2,2%)	01 (0,6%)	—	27 (15,1%)
1999	37 (20,8%)	—	01 (0,6%)	03 (1,7%)	06 (3,4%)	03 (1,7%)	50 (28,1%)
2000	23 (12,9%)	03 (1,7%)	01 (0,6%)	06 (3,4%)	04 (2,2%)	05 (2,8%)	42 (23,6%)
Total	106 (59,5%)	10 (5,6%)	02 (1,1%)	22 (12,4%)	28(15,8%)	10 (5,6%)	178 (100%)

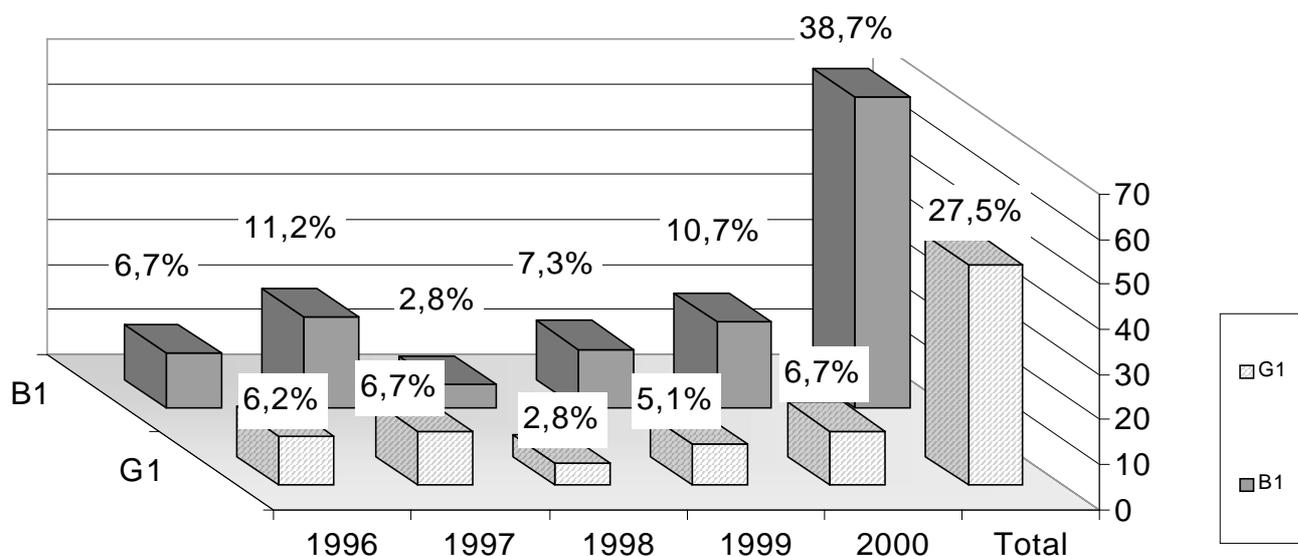


Figura 1. Distribuição Anual das Aflatoxinas B1 e G1 no total de amostras analisadas no período de Agosto/96 a Dezembro/00.

população jovem, principalmente, em idade escolar³¹, o que torna preocupante o índice de contaminação de 17,3% (31 amostras) encontrado neste estudo, para tais produtos.

Em relação a presença de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em amendoim cru, 28 (15,7%) amostras apresentaram-se positivas, semelhante ao relatado nas diversas publicações relativas a outras regiões do estado e do país^{8,9,18,31}, sugerindo que a população está exposta aos riscos devido ao consumo do produto.

Amostras com teores mais elevados de contaminação ocorreram em 1997, 1999 e 2000 variando entre 301 e 1255 $\mu\text{g}/\text{kg}$, (Tabela 2). De acordo com o boletim da Secretaria Estadual da Agricultura e Abastecimento, estes anos apresentaram índices de precipitação pluviométrica elevados, aliados a temperatura ambiente igualmente elevada²⁹.

Os resultados mostram que 15,8% das amostras contaminadas continham teores entre 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e cerca de 5,6% (10 amostras), apresentaram teores superiores a 10 vezes ou mais o limite máximo tolerado pela legislação do Ministério da Saúde (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^{3,15}.

Também foi observado na distribuição anual das amostras positivas, uma maior ocorrência da AFB_1 do que da AFG_1 (Figura 1). Considerando uma substância comprovadamente carcinogênica, tal fato, também verificado em outras publicações científicas, torna-se preocupante^{8,18,23,25}.

Destacamos a existência de divergência entre os limites máximos de tolerância estabelecidos pela Resolução GMC n° 56/94 MERCOSUL (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para $B_1+B_2+G_1+G_2$) do Ministério da Agricultura e pela Resolução n° 34/76 CNNPA (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para B_1+G_1)⁴. Os resultados mostraram que o índice de rejeição das amostras, considerando os diferentes limites das resoluções citadas, foram muito próximos (35,3% e 33,2%,

respectivamente) indicando que a diferença de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ não representa uma barreira para critérios de aceitação/rejeição do produto. Porém, o limite de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se apresenta mais adequado, visto que, a população estará exposta a ingestão de menores quantidades do contaminante estudado, considerando o poder toxigênico e o risco potencial da presença de aflatoxinas nos produtos alimentícios¹².

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram a necessidade de uma revisão, por parte do Ministério da Saúde, dos teores tolerados de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) vigentes atualmente, considerando a tendência mundial de diminuir os limites legais permitidos.

O limite de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresenta-se mais adequado por razões toxicológicas, sem representar prejuízos financeiros de grande monta para os produtores, considerando que o índice de rejeição mostrou-se da mesma ordem de grandeza, em relação aos limites tolerados pelas resoluções citadas.

Além disso, verifica-se a necessidade de monitoramento sistemático da ocorrência de aflatoxinas pois, o amendoim e seus produtos são bastante consumidos pela população, e de um controle mais efetivo das condições de colheita no campo, estocagem e transporte do amendoim, promovendo campanhas educativas na cadeia produtiva^{11,14}.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Dra Myrna Sabino pela orientação no estudo que originou esta publicação.

RIALA6/908

Santos, C.C.M. dos; Lopes, M. do R.V. e Kosseki, S.Y. Occurrence of aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of São José do Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):153-157, 2001.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the contamination of peanut and peanut products by aflatoxins commercialized in the region of São José do Rio Preto/SP. From August 1996 to December 2000, it was analyzed 178 samples, from which 77 were raw peanut, 31 "pé-de-moleque" candies, 48 peanut "paçocas" and 22 other peanut products (sweet and salty peanut and "torrone"). The samples were randomly collected, by the Group of Sanitary Vigilance of the Health Regional Administration (DIRXXII) in the retail trade of São José do Rio Preto region. The quantification of the aflatoxins B_1 and G_1 was made using the Soares & Rodriguez-Amaya method. The lower limit of quantification of $B_1 + G_1$ obtained in our laboratory was 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. From the whole samples of raw peanut analyzed, 24 (13.5%) presented contamination by $B_1 + G_1$ higher than 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (maximum established by the Health Ministry), 4 (2.2%) lower or equal to 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 49 (27.5%) lower than 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. From the "pé-de-moleque" samples, 13 (7.3%) exhibited contamination by aflatoxins $B_1 + G_1$ higher than 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 (1.1%) lower or equal to 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 16 (9.0%) lower than 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. From the peanut "paçoca" samples, 14 (7.9%) contained higher contaminants than 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 (1.1%) lower or equal to 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 32 (18%) lower than 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. For the other peanut products, 8 (4.5%) presented higher contamination than 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 (1.7%) lower or equal to 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 11 (6.2%) lower than 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. According to these results, the percentage of affected

samples by aflatoxin is around 39.3%, indicating that the investigation of the aflatoxin occurrence in food is of great importance to the development of control of products sensitive to that type of contamination.

KEY WORDS. Aflatoxins, peanut, peanut products.

REFERÊNCIAS

1. Association of Official Analytical Chemists – Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists, 16th, Arlington, Virginia, AOAC., 1995, p.49-1.
2. Baldissera, M.A. *et al.* Aflatoxinas, Ocratoxinas e Zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil – parte II. **Rev.Inst.Adolfo Lutz**, 53(1/2):5-10, 1993.
3. Brasil. Leis, Decretos, etc. Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial, Brasília, 19 jan. 1977. Sec I, pt. I, p.710.
4. Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 1.248/GM de 26 de novembro de 1993 do Ministério da Saúde. Ed. Lex – Marginalia, p.2802-2815. Aprova Diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos.
5. Brigido, B.M.; Badolato, M.I.C.; Freitas, V.P.S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na Região de Campinas/SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 55(2):85-90, 1995.
6. Busby, W.F.; Wogan, G.N. Naturally Occurring Carcinogens. In: LIENER, I.E., ed. – Toxic Constituents of plants foodstuff. 2ª ed., London, Academic Press., 1980, p.329-347.
7. Carrasco, V. Vigilância retira 390 kg de alimentos. **Diário da Região**, São José do Rio Preto/SP, 10 jan.2001. Cidades, p.4B.
8. Colaço, W.; Ferraz, U.; Albuquerque, R.L. Incidência de Aflatoxina em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife no período de 1989 a 1991. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 54(1):1-
9. Fonseca, H. *et al.* Ocorrência de aflatoxina em amendoim, no estado de São Paulo, durante os anos de 1988 e 1989. **Anais ESALQ**, 48:301-16, 1991.
10. Frazier, W.C.; Westhoff, D.C. Infecciones e Intoxicaciones Alimentarias de Naturaleza no Bacteriana. In: Microbiologia de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1979. p.127.
11. Furlong, E.B. *et al.* Aflatoxinas, Ocratoxinas e Zearalenona em alimentos da região Sul do Rio Grande do Sul. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(2):105-11. 1999.
12. Gelli, D.S.; Jakabi, M.; Porto, E. Isolamento de *Aspergillus* sp aflatoxigênicos de produtos alimentícios – São Paulo, Capital. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 50(1/2), p. 319, 1990.
13. IARC – Monographs on the Evolution Carcinogenic Risk to Human. Lyon, IARC – International Agency for Research on Cancer, Volume 56, 1993, p.245-395.
14. Mello, A.L. *et al.* Vigilância Sanitária de Medicamentos e Correlatos, Rio de Janeiro, Qualitymark ed. 1993, p.392.
15. Ministério da Agricultura, Portaria nº 183 de 21 de março de 1996, publicada pelo Diário Oficial da União de 25 março de 1996, seção I, p.4929.
16. Moreira, I. Construindo o Espaço Brasileiro, São Paulo, Editora Ática, 1998, v.2, p.271.
17. Mossel, D.A.A.; Garcia, B.M. Intoxicaciones alimentarias crônicas: micotoxicosis provocadas por mohos productores de toxinas activas por via oral. In: Microbiologia de Los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1975.
18. Oliveira, V. *et al.* Ocorrência de Aflatoxinas B1 e G1 em amendoim comercializado em Goiânia/G.O., Brasil. **Rev. Microbiol**, São Paulo, 22(4):319-22, 1991.
19. Prado, G. Incidência de Aflatoxina B1 em alimentos. **Rev. Farm. Bioquím.** Belo Horizonte. 5(2):147-157, 1989.
20. Prado, G.; Mattos, S.U.M.; Pereira, E.C. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 e 1988. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, 9:138-47, 1989.
21. Prata, W. Vigilância interdita produtos alimentícios. **Folha de Rio Preto**, São José do Rio Preto/SP, 10 jan.2001. Geral, p.4.
22. Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Aflatoxinas, MERCOSUL/GMC/Res. Nº 56/94.
23. Sabino, M. Variações de níveis de aflatoxinas B1 em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 40(2):153-8, 1980.
24. Sabino, M.; Inomata, E.I.; Lamardo, L.C.A. Variação dos níveis de aflatoxina em pastas de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 42(1/2):39-44, 1982.
25. Sabino, M. *et al.* A survey of the occurrence of aflatoxins in groundnuts (peanuts) and groundnut products in São Paulo State/Brazil in 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1):53-57, 1999.
26. Sabino, M. *et al.* Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the State of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.** 30:85-88, 1999.
27. Sabino, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Mycotoxin research in Brazil. **Rev. Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)**, 45(6):359-71, 1993.
28. São Paulo – Comunicado CVS – 19 de 23.2.94. Diário Oficial, São Paulo, 24.fev.1994, sec. I, 104 (36, p.19). Comunica às Vigilâncias Sanitárias dos Escritórios Regionais de Saúde que deverá realizar as colheitas de amostras dos produtos relacionados conforme o programa para 1994.
29. São Paulo – Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Escritório de Desenvolvimento Rural de São José do Rio Preto. Precipitação Pluviométrica, Documento de Divulgação, 1995-1999.
30. Scussel, V.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980 a 1982. **SBCTA**, Campinas, 19(2):109-19, 1985.
31. Silva, J.C.; Oliveira, J.N.; Caldas, E.D. Aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(2):49-52, 1996.
32. Soares, L.M.V.; Rodrigues-Amaya, D.B. Survey of aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and Sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi – toxin thin – layer chromatographic method. **J. Assoc of. Off. Anal. Chem.**, 72:22-6, 1989.
33. World Health Organization – Mycotoxins – In: Environmental Health Criteria 11, Geneve, WHO, 1979. p.127.
34. Zorzetto, M.A.P.; Sabino, M. Regulamentos e normas para aflatoxinas em alimentos – CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), Mercosul, Codex Alimentarius e CE (Comissão Européia). **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, 213:18-20, 1999.

Recebido em 09/05/2000; Aprovado em 04/04/2002

Determinação do teor do princípio ativo e avaliação da inocuidade dérmica e ocular de produtos para o tratamento de ectoparasitoses contendo lindano

Quantitative determination of active principle and evaluation of the dermal and ocular safety to treatment of ectoparasitosis products containing lindane

Lígia L. MIYAMARU^{1*}
Maria Cristina SANTA BÁRBARA¹
Maria Helena IHA²
Deusdete A. TEIXEIRA³
Odair ZENEON⁴

RIALA6/909

Miyamaru, L.L. *et al.* Determinação do teor do princípio ativo e avaliação da inocuidade dérmica e ocular de produtos para o tratamento de ectoparasitoses contendo lindano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):159-162, 2001.

RESUMO. O objetivo deste estudo foi determinar o teor do princípio ativo e avaliar a inocuidade dérmica e ocular em amostras de produtos contendo 1% de lindano (m/m), que são utilizados para o tratamento de ectoparasitoses: pediculoses e escabioses. Foram analisadas 06 (seis) amostras de produtos: um xampu, um creme, dois sabonetes e duas loções, de diferentes marcas. O teor de lindano das amostras foi realizado de acordo com a Farmacopéia Americana, 1995. Os testes de irritação dérmica e ocular foram realizados de acordo com o método de Draize modificado nas amostras e nas soluções alcoólicas de lindano em diferentes concentrações. Foi efetuado também o teste nas amostras conforme o modo de uso, isto é, de acordo com as instruções de uso fornecidas pelos fabricantes dos produtos analisados. Os resultados obtidos referentes ao teor de lindano mostraram que as amostras analisadas estavam de acordo com o teor especificado no rótulo. Os resultados dos exames toxicológicos das amostras demonstraram que os produtos aplicados de acordo com o modo de uso não evidenciaram danos à pele dos animais testados. Porém, quando submetidos ao teste de irritação dérmica cumulativa, isto é, através de repetidas aplicações do produto, apresentaram irritação, mostrando que o produto utilizado de forma não correta poderá acarretar lesão à pele e conseqüentemente comprometer a saúde do consumidor devido à toxicidade do lindano.

PALAVRAS-CHAVE. lindano, produtos para tratamento de ectoparasitoses, inocuidade.

¹ Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene – Divisão de Bromatologia Química – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

² Laboratório I de Ribeirão Preto – Instituto Adolfo Lutz.

³ Bolsista FEDIAL.

⁴ Divisão de Bromatologia e Química – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César, CEP: 01246-902 – São Paulo/SP. Fone: (011) 3068-2919. e-mail: lmiyamaru@ial.sp.gov.br

Existe no comércio uma variedade de produtos para o tratamento de ectoparasitoses: xampus, cremes, sabonetes, etc, contendo em sua formulação 1% (m/m) de lindano (isômero γ do hexacloro-ciclohexano), direcionados ao combate e ao tratamento de ectoparasitoses: pediculoses e escabioses, vulgarmente conhecidas como “piolho” e “sarna”, em adultos e crianças. Estas infestações são comuns, especialmente na camada mais pobre^{1,15}, podendo causar algumas doenças e dermatites^{17,18}.

A inocuidade cutânea e ocular de produtos contendo lindano está relacionada com a característica química do princípio ativo e/ou de outros componentes. Os cosméticos, dependendo de sua composição básica e da qualidade das matérias-primas utilizadas, poderão ocasionar irritação da pele e dos olhos.

De acordo com Cucê & Duarte⁴, a concentração do lindano a 1% (m/m) nos produtos acima mencionados é eficiente no tratamento de ectoparasitoses. Devido à baixa atividade ovicidal do lindano, a aplicação do produto deve ser repetida após uma semana para erradicar piolhos provenientes das lêndeas^{6,8}.

O tratamento de ectoparasitoses com lindano é considerado seguro e eficaz quando utilizado dentro das doses recomendadas e usado corretamente^{2,3,21}; porém, efeitos adversos usualmente podem ocorrer como resultado de exposição a altas doses provenientes de uso indevido^{5,6,9,10}.

Em função de sua toxicidade, o uso dos produtos contendo lindano deve ser restrito somente a indivíduos que não apresentam doenças de pele tais como psoríase, eczemas ou ictiose⁷; nestes casos, pode-se originar absorção sistêmica significativa do lindano através de fissuras cutâneas profundas que freqüentemente ocorrem em pacientes com escabioses²⁰.

No Brasil, as infestações por escabioses e pediculoses ocorrem em escolas¹, orfanatos¹², ambulatório^{13,14,15} e hospitais¹⁶, havendo a necessidade da aplicação de inseticidas para o controle e tratamento destas ocorrências. O lindano, por ser eficaz e relativamente barato, é utilizado com freqüência para o tratamento destas ectoparasitoses.

Em razão da necessidade de preservar a saúde do consumidor, o objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração do lindano e a irritação dérmica/ocular, dos produtos contendo lindano, comercializados na cidade de São Paulo.

Foram analisadas 6 (seis) amostras de produtos contendo lindano: um xampu, um creme, dois sabonetes e duas loções, de diferentes marcas comercializadas na cidade de São Paulo, sendo que uma amostra foi coletada pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo e as demais adquiridas no comércio da cidade de São Paulo.

A quantificação do lindano nas amostras de loções, xampu e creme foi realizada de acordo com a Farmacopéia Americana²². Após eluição do princípio ativo com solução de éter etílico:hexano (18:280) em coluna de florissil, a amostra foi evaporada, diluída em diclorometano e analisada no cromatógrafo a gás, marca CG 370, utilizando coluna empacotada com 2% DC-200 + 2% QF-1 e detector de ionização de chama. As condições

cromatográficas estabelecidas foram: temperaturas do detector 240 °C, injetor 230 °C e coluna 198 °C.

Para o sabonete, foi utilizado o mesmo método, diferindo apenas no tratamento prévio da amostra, que consistiu na trituração e homogeneização do sabonete, antes da extração do lindano.

Para se avaliar os possíveis interferentes nas amostras analisadas, foi efetuado o mesmo procedimento acima descrito com amostra “branco”, que foram preparadas com as matérias-primas utilizadas na formulação dos excipientes de cada produto. Foi realizado teste de recuperação em amostras “branco” enriquecidas com lindano em 3 níveis de concentrações diferentes: 0,5; 1,0 e 2,0% (m/m), em duplicata, para cada um dos produtos estudados.

Nas amostras dos produtos de higiene e nas soluções alcoólicas de lindano em diferentes concentrações: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50% (m/v), foram efetuados os seguintes exames toxicológicos: irritação dérmica primária e cumulativa, além da ocular; os mesmos exames foram realizados com os “brancos” dos produtos, e com o etanol p.a.

Para os exames de irritação dérmica primária, cumulativa e conforme o modo de uso dos produtos constantes das especificações do rótulo foram utilizados 6 (seis) coelhos para cada teste. No exame de irritação ocular, foram utilizados 5 coelhos para cada teste.

Os testes de irritação dérmica e ocular foram realizados de acordo com o método de Draize modificado¹¹.

No método de irritação dérmica primária a amostra foi aplicada nas regiões dorsais tricotomizadas, superiores e inferiores (áreas 1 e 2) enquanto que as áreas 3 e 4 serviram de controle. Estas áreas foram cobertas com gaze estéril fixada ao animal com fita adesiva hipo-alérgica (tensoplast). Foi retirado o “patch oclusivo” e efetuadas as leituras de edema e eritema após 24 e 72 horas. Para a irritação dérmica cumulativa, foi utilizado o método de acordo com o citado acima, sendo a aplicação efetuada com freqüência diária durante um período de 10 dias consecutivos e a leitura de edema e eritema no 11º dia.

No caso da irritação ocular, a amostra foi aplicada em um dos olhos de um coelho enquanto que o outro foi considerado como controle. A leitura de opacidade e pannus foi efetuada na região da córnea; a irite na região da íris, enquanto que a hiperemia, quemose e secreção, na região da conjuntiva. Estas leituras foram efetuadas no período de 24, 48, 72 horas e 7 dias.

No teste conforme modo de uso as amostras de sabonete e xampu foram friccionadas até espumar, deixado por 10 min e depois enxaguado, este procedimento foi repetido após 3 e 14 dias. Para as amostras de loção e creme foram friccionados o produto e deixado permanecer, este procedimento foi repetido após 3 e 14 dias.

Os resultados do teste de recuperação efetuado em três níveis de concentrações diferentes variaram de 98,8 a 109,7%, demonstrando que o método analítico selecionado para a quantificação do lindano nos vários produtos analisados foi adequado. As análises dos produtos contendo lindano, das

Tabela 1. Teor de lindano nos produtos de higiene analisados.

Produto	Lindano (g/100g)
Xampu	1,09 ± 0,01
Sabonete A	1,07 ± 0,09
Sabonete B	1,10 ± 0,02
Loção A	0,95 ± 0,03
Loção B	1,00 ± 0,04
Creme	1,03 ± 0,03

marcas disponíveis no mercado, revelaram em todas amostras, que o teor do princípio ativo estava dentro dos valores especificados na rotulagem (Tabela 1).

Quanto ao teste para avaliar a inocuidade, dérmica e ocular do lindano, a escolha do etanol p.a como solvente da referida substância química fundamentou-se na comprovação experimental que este solvente não apresentou irritação nos animais utilizados no experimento. Os resultados revelaram que em concentrações acima de 1,25% (m/v), o lindano apresentou grau de toxicidade dérmica, portanto com potencial para causar danos aos usuários.

Os testes toxicológicos realizados nos “brancos” dos produtos estudados não apresentaram irritação. A Figura 1 mostra que no teste de irritação dérmica cumulativa, que é realizado por repetidas aplicações do produto, observou-se que as duas amostras de sabonetes e a de xampu apresentaram grau de irritação moderadamente irritante (MI), e as demais amostras, grau ligeiramente irritante (LI). Para o teste de irritação dérmica primária, a amostra de xampu apresentou grau de irritação LI.

Para verificar a possível causa da irritação dérmica primária observada na amostra de xampu, foi realizado teste utilizando amostra “branco” de xampu com adição de lindano a

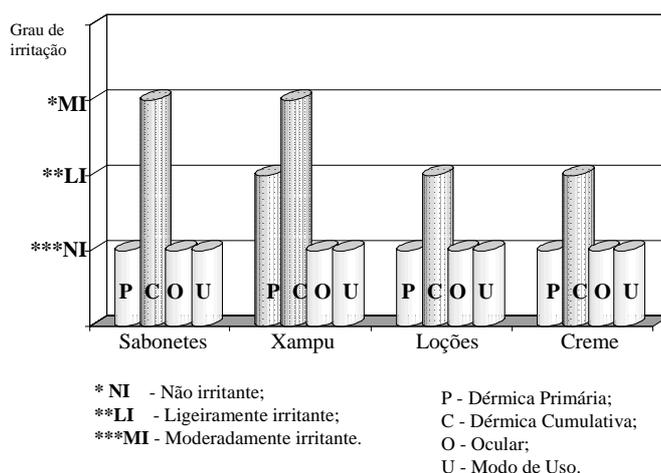


Figura 1. Grau de irritação obtido nos testes toxicológicos dos produtos de higiene analisados.

1% (m/v) que apresentou grau de irritação dérmica LI. Como a amostra branca do xampu e a solução alcoólica de lindano a 1% (m/v) não apresentaram irritação, esses resultados sugerem, que a irritação causada por estes produtos resultou da ação sinérgica de alguma matéria-prima componente da formulação do xampu, potencializando o efeito do lindano e facilitando a sua penetração através da pele^{2,4,19}.

De acordo com os dados obtidos, concluímos que esses produtos devem ser utilizados de acordo com o modo de uso recomendado pelo fabricante, pois quando empregados erroneamente, isto é, com aplicações repetitivas do produto ou com uma concentração acima da preconizada (1% de lindano) poderá causar danos ao usuário, tornando um sério problema de Saúde Pública.

RIALA6/909

Miyamaru, L.L. *et al.* Quantitative determination of active principle and evaluation of the dermal and ocular safety to treatment of ectoparasitosis products containing lindane. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):159-162, 2001.

ABSTRACT. The aim of this study was the quantification of the drug as well as dermal and ocular safety evaluation in samples containing 1% lindane (w/w), that are used in the treatment of ectoparasitosis: pediculosis and scabies. Six samples were analyzed: a shampoo, a cream, two bars of toilet soap and two lotions of different brands. The quantification method was described in the United States Pharmacopeia, 1995. Tests of dermal and ocular irritation using the method of Draize with modification were done in samples and lindane alcoholic solutions in different concentrations. In samples, also the test was done according to the manufacturer's directions for use and composition. The results of the lindane quantification showed that the analyzed samples were in accordance with the label. The results of the toxicological tests showed that, when applied according to manufacturer's directions, the products using did not damage the skin or the eyes of the animal. However, when the samples were submitted to the cumulative dermal test, implying repeated application of the product, they showed dermal irritation. So the incorrect use was proved to cause skin damage and compromise the customers's health due to the lindane toxicity.

KEY WORDS. Lindane, treatment of ectoparasitosis products, safety.

REFERÊNCIAS

1. Bechelli, L.M.; Haddad, N.; Pagnano, P.M.G. Censo epidemiológico de lesões e afecções cutâneas em escolares de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Arch. Argent. Dermat.**, 40(1):45-59, 1990.
2. Boffa, M.J.; Brough, P.A.; Ead, R.D. Lindane neurotoxicity. **Br. J. Dermatol.**, 133:1013, 1995.
3. Clotet, B.; Sirera, G.; Ferrandiz, C. Scabies. **N. Eng. J. Med.**, 332(2):611, 1995.
4. Cucê, L.C.; Duarte, A.A. Hexacloro de gama benzeno – lindano. **F. Med.**, 96(3):149-51, 1988.
5. Downs, A. Comparing antiscabies treatments, **Arch. Dermatol.**, 133(4):526, 1997.
6. Eichensfield, L.F.; Colon-Fontanez, F. Concise reviews of pediatric infectious diseases – Treatment of head lice. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 17(5):419-22, 1998.
7. Elgart, M.L. A risk-benefit assessment of reagents used in the treatment of scabies. **Drug. Saf.**, 14(6):386-93, 1996.
8. Elston, D.M. What's Eating You? *Pediculus humanus* (head louse and body louse), **Cutis**, 63(5):259-64, 1999.
9. Finkelstein, L.E.; Mendelson, M.H. Moore, A.V. Stopping the spread of scabies. **Am. J. Nurs.**, 97(10):68-9, 1997.
10. Fischer, T. Lindane toxicity in a 24-year-old woman. **Ann. Emerg. Med.**, 24(5):972-4, 1994.
11. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde-INCQS/FIOCRUZ. Manual da Qualidade – Ensaio de irritação cutânea primária; Ensaio de irritação cutânea repetida; Ensaio de irritação ocular. Rio de Janeiro, 1987.
12. Mendonça, I.R.S.M.; Hernandez, O.E.N.; Perdomo, J.G. Inquérito epidemiológico das dermatoses numa instituição infantil, **An. Acad. Nac. Med.**, 155(2):85-8, 1995.
13. Murahovschi, J.; Rodrigues, E.M.; Teruya, K.M. *et al.* Avaliação da eficácia e tolerabilidade do lindano 1% no tratamento de escabiose e pediculose. **Rev. Paul. Pediatr.**, 6(20):25-7, 1988.
14. Obadia, I. Pediculose de couro cabeludo. Tratamento com o Gama-hexaclorociclohexano (Lindane). **Rev. Bras. Med.**, 39(11):709-12, 1982.
15. Oliveira Filho, J. *et al.* Casuística do ambulatório de dermatologia da Faculdade de Medicina de Santo Amaro no Período de cinco anos. **J. Bras. Med.**, 68(5):139-44, 1995.
16. Pereira, V.P. Borenstein, M.S.; Erdmann, A.L. Experiência de atenção de enfermagem no controle da pediculose num macro hospital psiquiátrico estatal, durante 10 anos. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, 47(1):20-6, 1994.
17. Rey, L. Acarí: Os ácaros da escabiose e de outras dermatoses. In: REY, L. **Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1991, p.657-61.
18. Rey, L. Anopluros: Os piolhos sugadores. In: REY, L. **Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan SA., 1991, p.645-8.
19. Solomon, B.A.; Haut, S.R.; Carr, E.M. *et al.* Neurotoxic reaction to lindane in an HIV-seropositive patient. An old medication's new problem. **J. Fam. Pract.**, 40(3):291-6, 1995.
20. Spach, D.H.; Fritsche, T.R. Scabies. **N. Engl. J. Med.**, 332(2):612, 1995.
21. Subercaseaux, M.L.P.C.; Trueba, M.S.Z. Pediculosis y escabiosis. **Bol. Esc. Med.**, 25:40-3, 1996.
22. United States Pharmacopeia 23 ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 892-3, 1995.

Recebido em 31/08/2000; Aprovado em 04/04/2002

Caracterização físico-química e nutricional da polpa de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) para aproveitamento industrial.

Macedo, S.H.M. **Caracterização físico-química e nutricional da polpa de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) para aproveitamento industrial.** Manaus; 1999. [Dissertação de Mestrado – Universidade do Amazonas – UA, Manaus/AM].

Neste estudo, avaliou-se as características químicas e nutricionais da polpa de 17 populações de cubiu (*S. sessiliflorum* Dunal), fruto típico da Amazônia Ocidental, oriundas da estação experimental de olericultura, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Após esta avaliação, selecionou-se a população mais apropriada considerando-se os atributos, tamanho do fruto, conteúdo de fibra alimentar e disponibilidade para produção de geléia. No ensaio tecnológico, utilizou-se cerca de 50 kg de frutos da etnoveriedade de Benjamin Constant – AM (Pop. 4 II), de tamanho grande, efetuando-se assim o beneficiamento da polpa. Após 11 testes experimentais foram selecionadas duas formulações seguindo melhor aspecto, sabor e consistência de geléia. Essas duas formulações foram submetidas à Análise Sensorial utilizando-se um grupo de 30 pessoas adultas. Os resultados indicaram que o cubiu é um

fruto hipocalórico (33,7 Cal/100 g), com considerável quantidade de água ($90,2 \pm 1,1\%$) e fibra alimentar total ($2,08 \pm 0,5\%$). A etnoveriedade estudada apresentou um bom rendimento de polpa beneficiada (cerca de 50%), bom conteúdo de pectina total ($445,1 \text{ mg} \pm 0,6\%$), propriedade muito favorável para elaboração de produtos como geléia, entre outros. As duas formulações não apresentaram diferenças significativas quanto ao sabor e aspecto geral, podendo serem elaboradas em escala industrial. O conteúdo de fibra alimentar, especialmente a fração solúvel, sugere estudo mais detalhado desse componente no fruto estudado.

* Tese disponível na biblioteca da Universidade do Amazonas – UA – Manaus/AM.

Significado de prognóstico do rearranjo de gene para receptor da célula T gama em Mieloma Múltiplo

BORIOLI, R.A. **Significado de prognóstico do rearranjo de gene para receptor da célula T gama em Mieloma Múltiplo.** São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].

A presença de monoclonalidade de células T em pacientes com Mieloma Múltiplo tem sido identificada; no entanto, o exato mecanismo de ação destas células no processo da doença permanece desconhecido. Alguns estudos têm sugerido que estas células T monoclonais apresentariam uma função imunomoduladora sobre as células neoplásicas. No presente trabalho, procuramos avaliar o significado de prognóstico da presença do rearranjo clonal de gene TCR γ em 61 amostras provenientes de sangue periférico e/ou medula óssea de 33 pacientes com Mieloma Múltiplo por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase. Estas amostras foram colhidas em diferentes fases da doença: ao diagnóstico, remissão, recidiva e estável. Como estratégia para amplificação deste rearranjo foram utilizados oligonucleotídeos (“primers”) para as famílias de regiões variáveis V γ I, V γ II e V γ 9. Em nossa investigação a presença do rearranjo de gene TCR γ foi detectada em 21 amostras (34,4% do total de amostras) e a frequência de utilização para as regiões variáveis na detecção deste rearranjo foi para V γ I (47,6%), V γ II (90,5%) e V γ 9 (42,9%). A correlação entre os estádios I, II e III segundo Durie & Salmon e a presença do

rearranjo de gene TCR γ não foi estatisticamente significativa ($p=0,341$). Não foi encontrada associação entre a presença do rearranjo de gene TCR γ e a origem do material analisado (sangue periférico e/ou medula óssea) ($p=0,568$). Quando comparadas as curvas de sobrevida em função da presença do rearranjo de gene TCR γ em algum momento da doença não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,302$). As medianas de sobrevida dos pacientes com ausência e presença do rearranjo de gene TCR γ não foram atingidas e a probabilidade de sobrevida aos 35 meses de seguimento foi de 60% para os pacientes com ausência do rearranjo e de 80% para os pacientes com presença do rearranjo. Apesar do nível descritivo (p) não significativo, existe uma tendência a uma maior sobrevida no grupo de pacientes com presença do rearranjo de gene TCR γ , contudo, esta questão só poderá ser definitivamente elucidada à partir de um acompanhamento maior dos casos.

*Tese disponível na biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Isolamento e identificação dos vírus da Influenza A em aves silvestres residentes e migratória no Estado de São Paulo.

Kawamoto, N.H.A. **Isolamento e identificação dos vírus da Influenza A em aves silvestres residentes e migratória no Estado de São Paulo.** São Paulo; 1999. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da USP].

Foram isolados 13 amostras de vírus da Influenza A, provenientes de 10 aves das espécies *Elaenia mesoleuca*(2), *Sporophila lineola*(1), *Sporophila caerulea*(1), *Columbina talpacoti*(2), *Vireo olivaceus*(2), *Paroaria dominicana*(2), em dois tipos de coleta(oral e cloacal). Estas aves são frequentadoras das estações experimentais de campo, localizadas no Parque Ecológico do Tiête – Guarulhos, Iguape e Juquitiba/SP. As coletas foram feitas entre os meses de novembro/97 a janeiro/98. As amostras foram inoculadas nas cavidades, amniótica e alantóica de ovos embrionados de galinha “spf” e em culturas de células de linhagem contínua, MDCK (rim de cachorro – ATCC-CC L34) e NCI-H292 (Carcinoma Mucoepidérmoide de pulmão humano – ATCC – CC 1848). Os isolados apresentaram atividades hemaglutinantes pela técnica de Hemaglutinação, com suspensão a 0,5% de hemácias de galo ou de cobaia e efeitos citopáticos nas duas linhagens celulares. A identificação dos antígenos foi realizada pelo teste de Inibição de Hemaglutinação, com soros imunes de humanos vacinados com as cepas dos vírus influenza A/SP/1/91(H1N1), A/SP/1/90(H3N2) e, com soros de eqüinos vacinados com as cepas A/Eq1/SP/1/56(H7N7) e A/Eq2/SP/1/85(H3N8) e com

soro de cobaia imunizado com o vírus da Doença de Newcastle. As amostras citadas apresentaram afinidades antigênicas com soros de humanos e de eqüinos com exceção das amostras LE6745 (oral e cloacal) que não reagiram com soro de eqüinos. Nestas amostras foram detectadas, pela técnica de contrastação negativa em microscopia eletrônica, partículas virais de 35 a 520 nm, com espículas similares às de Ortomixovírus.

Com estes dados, ressalta a necessidade do desenvolvimento de um estudo mais acurado da epidemiologia de Influenza, através dos isolados aviários aqui manipulados ou de outros fornecidos pela literatura. Desta forma, levanta-se a possibilidade de se fazer a definição das espécies reservatórias e veiculadoras que estariam participando em vida selváticas. A presença de mamíferos, aí incluindo o homem, nas regiões estudadas, pode estar favorecendo o surgimento de cepas emergentes que, possivelmente, estariam participando da transmissão da do vírus da influenza entre esses mamíferos, tal como refere Webster *et al.*, 1997, em seus estudos.

Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite B – Estudo Imuno-histoquímico com ênfase na detecção dos antígenos HBe e HBx

Santos, R.T.M. **Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite B – Estudo Imuno-histoquímico com ênfase na detecção dos antígenos HBe e HBx.** São Paulo, 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

O presente estudo visou a detecção de antígenos (AgHBe e AgHBx) do vírus da hepatite B (VHB) por método imuno-histoquímico Envision+ peroxidase. Foi ainda pesquisada a distribuição e inter-relação entre estes antígenos, bem como com marcadores sorológicos de replicação viral (DNA-VHB, AgHBe), com AgHBc no tecido, e com os principais indicadores histológicos de estadiamento dos distúrbios da arquitetura hepática e o grau de atividade necro-inflamatória. A casuística compreendeu 196 amostras de fígado fixadas em formol e incluídas em parafina de pacientes com os vários estádios de hepatopatia crônica associada ao VHB. Os resultados mostra-

ram positividade imuno-histoquímica para AgBHe em 63/196 (32,1%) casos, tanto no citoplasma como no núcleo de hepatócitos. Já a pesquisa de AgHBx resultou positiva em 59/196 (30,1%) casos, localizada preferencialmente no citoplasma de hepatócitos, mas também apresentou positividade nuclear. Ambos, AgHBe e AgHBx não se mostraram eficientes como marcadores de replicação viral nos 59 casos com informe sorológico sobre a presença de DNA-VHB, padrão-ouro para replicação viral no soro. Quando analisamos a imuno-expressão de AgHBe frente às alterações histológicas, nossos resultados demonstraram uma tendência de associação entre a presença

de AgHBe citoplasmático com o grau de alterações arquiteturais, com presença relativamente abundante deste antígeno nas fases intermediárias da lesão (estádios 2 e 3), sendo virtualmente ausente nos carcinomas hepatocelulares (CHC). O AgHBe mostrou ainda associação significativa com o grau de atividade necro-inflamatória parenquimatosa, podendo indicar a participação deste antígeno na patogênese destas lesões nas hepatites B crônicas. Já a imuno-expressão do AgHBx mostrou associação significativa com o grau de distúrbios arquiteturais, com

positividade predominante nos casos de cirrose e CHC, coerente com dados experimentais, apontando para a participação desta proteína nas fases precoces da carcinogênese associada ao VHB. O encontro de reatividade moderada para AgHBx em três casos de hepatite crônica sem cirrose tornam necessários estudos futuros, avaliando a possibilidade de imuno-expressão deste antígeno, mesmo em infecções com vírus em condição episomal, ou ainda, analisando o significado biológico da integração do genoma viral em fases iniciais da infecção.

*Tese disponível na biblioteca do I.A.L.

ERRATA DO VOLUME ANTERIOR

Rev. Instituto Adolfo Lutz, 60(1), 2001

Artigo RIALA6/885

Frequência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP - Brasil.

Pag. 11: no título do artigo em inglês: *Cryptosporidium spp* e não *Cryptosporidium sp*

Pag. 14 : no título do Abstract: *Cryptosporidium spp* e não *Cryptosporidium sp*

Artigo RIALA6/897

Comunicação científica: Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP - Brasil

Pag. 89: no título da comunicação em português: *Cryptosporidium sp* e não *Cryptosporidium spp*

Pag. 89: no título do resumo em português: *Cryptosporidium sp* e não *Cryptosporidium spp*

Pag. 90: Como oocisto é pequeno (4 a 6 mm) e não (4 a 6 mm)

Os resultados revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp, medindo de 4 a 5 mm e não 4 a 5 mm.

Pag. 91: Abstract: The objective of the present study.....vegetables marketed in the city of Ribeirão Preto, Brazil e não in the city Ribeirão Preto, Brasil.

AGRADECIMENTOS AOS RELATORES

A comissão de redação agradece aos colaboradores deste volume

- CRISTIANE BANALDI CANO
I.A.L. – CENTRAL – BROMATOLOGIA E QUÍMICA
- SABRIA AUED PIMENTEL
I.A.L. – CENTRAL – BROMATOLOGIA E QUÍMICA
- CHRISTIANE ASTURIANO RISTORI
I.A.L. – CENTRAL – BROMATOLOGIA E QUÍMICA
- MARIA ÂNGELA POMPEU ZORZETTO
I.A.L. – CENTRAL – BROMATOLOGIA E QUÍMICA
- MARILDA DUARTE
I.A.L. – CENTRAL – BROMATOLOGIA E QUÍMICA
- MYRNA SABINO
I.A.L. – CENTRAL – BROMATOLOGIA E QUÍMICA
- CECÍLIA LUIZA SIMÕES
I.A.L. – CENTRAL – BIOLOGIA MÉDICA
- EIDE DIAS CAMARGO
I.A.L. – CENTRAL – BIOLOGIA MÉDICA
- JOSÉ EDUARDO TOLEZANO
I.A.L. – CENTRAL – BIOLOGIA MÉDICA
- ANA MARIA MARASSA
I.A.L. – CENTRAL – BIOLOGIA MÉDICA
- DOMINGAS M. A. VIEIRA TORRES
I.A.L. – CENTRAL – BIOLOGIA MÉDICA
- HERMÍNIA Y. KANAMURA
I.A.L. – CENTRAL – BIOLOGIA MÉDICA
- DIVANI MARIA CAPUANI
I.A.L. – LABORATÓRIO REGIONAL DE RIBEIRÃO
PRETO
- APARECIDA HELENA DE SOUZA GOMES
I.A.L. – LABORATÓRIO REGIONAL DE SOROCABA
- LILIANA B. BACCETTI
I.A.L. – LABORATÓRIO REGIONAL DE RIO CLARO
- GERMINIO NAZÁRIO
I.A.L. – CENTRAL – APOSENTADO
- GUILHERME PRADO
FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS
- TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO
USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
- HENRIQUE VALFRE
VALMARI LABORATÓRIO
- HEITOR FRANCO DE ANDRADE JUNIOR
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL - SP
- PEDRO PAULO CHIEFFI
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
- REGINA CÉLIA A. LAGO
EMBRAPA – RIO DE JANEIRO
- JANE MENEGALDO TURATTI
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ALIMENTOS
- LUIZ HENRIQUE BEIRÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
- JOAO ARISTEU DA ROSA
UNESP/ ARARAQUARA
- ELIZABETH A. F. S. TORRES
USP / FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
- LIRENY A. G. GONÇALVES
FEA/UNICAMP
- NEURA BRAGAGNOLO
FEA/UNICAMP
- ELIANA ROXO
INSTITUTO BIOLÓGICO
- CLARICE QUEICO FUJIHARA LEITE
UNESP/ARARAQUARA
- CÉLIA SYLOS
UNESP/ ARARAQUARA
- MARIA LÚCIA RIBEIRO
UNESP/ ARARAQUARA
- GILBERTO CASADEI DE BAPTISTA
ESALQ/PIRACICABA
- AMIR GEBARA
INSTITUTO BIOLÓGICO
- IZILDINHA MORENO
ITAL
- DÉLIA R. AMAYA
FEA/UNICAMP
- MARIA LÚCIA RACZ
USP / FAC. CIÊNCIAS BIO
- EUNICE APARECIDA BIANCHI GALATI
USP / FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
- ELIZABETH W. MENEZES
USP/ FAC. CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Impressão e Acabamento:

WINNER
Graph

(011) 5584-5753

ISSN 0073-9855



9 770073 985009