



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN0073-9855

RIALA 6

VOLUME 50

NÚMERO 1/2

JUNHO/DEZEMBRO 1990



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP-BRASIL.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

ANÍSIO DE MOURA
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

ODAIR ZENEON, Presidente
CARMO ELIAS ANDRADE MELLES
ELISEU ALVES WALDMAN
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO
JOSÉ EDUARDO TOLEZANO
JOSÉ LEOPOLDO FERREIRA ANTUNES
MYRNA SABINO
NEUS PASCUET PREGNOLATTO
VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES

REDATOR-SECRETÁRIO

LIEGE APARECIDA DE CASTRO SANTOS

Endereço/address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 — Caixa Postal 7027
01000 — São Paulo, SP - Brasil

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

(*)

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

1941 — 1988, 1-48

1990, 50 (1/2)

ISSN 0073-9855
RIALA6



CDD₁₈614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas*. São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Abstracts on Higiene and Communicable Diseases, AGRINDEX, Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia, 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 outros.



DÉBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

No dia 2 de junho de 1990, o Instituto Adolfo Lutz perdeu uma de suas mais preciosas colaboradoras: Débora Domingues Estrella Rebocho.

Nascida em 24 de maio de 1921, em São Paulo, foi casada com Paulo Roberto Cardoso Rebocho, médico cardiologista, professor de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Escola de Enfermagem Santa Catarina, e mãe de Paulo Roberto Cardoso Rebocho Filho, advogado.

Sua reconhecida competência na área de Editoração Científica principiou ao participar da revisão dos trabalhos científicos de seu marido, publicados nas diversas Revistas Científicas da área médica, de quem foi colaboradora durante vinte anos.

Viúva, iniciou brilhante carreira em 15 de setembro de 1959, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde permaneceu até sua admissão no Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em 12 de setembro de 1960, onde exerceu suas atividades até sua aposentadoria.

Eclética, participou de vários cursos nas mais diferentes áreas e sempre compartilhou seus conhecimentos com todos aqueles que a procuravam.

Logo no início de sua carreira recebeu um elogio formal do Secretário da Saúde, quando em visita à Biblioteca do Instituto, pela verificação da qualidade e alta eficiência dos serviços prestados.

Durante trinta anos de efetivo exercício, foi redatora da Revista do Instituto Adolfo Lutz, desde o volume 22 até 49(2).

Sob sua responsabilidade foram publicadas duas edições do Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, a primeira em 1976 e a segunda em 1985, tendo sido homenageada pela Divisão de Bromatologia e Química quando da publicação da última edição.

Por sua mesa passaram inúmeras teses de mestrado e doutorado, além de artigos a serem publicados em diversas Revistas, com os quais colaborava anonimamente.

Por ocasião do Jubileu de Prata do Instituto, foi competente organizadora das festividades.

Todos aqueles que tiveram o privilégio de seu convívio sabem de seu dinamismo, competência e profundo senso profissional. Perfeccionista, incansável e amiga leal, nunca se limitou ao exercício de suas atribuições. Pode-se com segurança afirmar que era mais colaboradora do que revisora dos artigos que lhe eram confiados e se orgulhava da capacidade de extrair dos autores a palavra correta, o sentido exato, para a valorização dos trabalhos.

É realmente uma pena que ela, que com tanta dedicação revisou todos os artigos da Revista durante tantos anos, não possa agora colaborar com esta simples homenagem que o Instituto lhe presta.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos

- 683 *Enhanced sensitivity of dot-immunobinding assays for the detection of antibodies in mice by the use of mild detergent extracted Trypanosoma cruzi antigens.*
A utilização de detergente na extração de antígenos de *Trypanosoma cruzi* aumentou a sensibilidade da reação imunoenzimática (Dot-immunobinding assay), para a quantificação de anticorpos de camundongos.
DE GASPARI E. N.; STOLF A.M.S. & ABRAHAMSOHN, I.A..... 231-233
- 684 *Pirogenicidade de soluções de grande volume para uso endovenoso.*
Pirogenicity of large volume endovenous solutions.
ALVES, W.; NOVO, O.F.; FONSECA, I.E.M. & ALVES, H.I..... 235-238
- 685 *Sucos de maracujá, tamarindo e uva: métodos de análise das condições higiênicas.*
Passiflora fruit, tamarind and grape juices: methods for determination of sanitary quality.
SANTOS, M.C.; RODRIGUES, R.M.M.S. & ZAMBONI, C. Q..... 239-243
- 686 *Farinha de rosca: matérias estranhas pesadas e leves.*
Surplus-bread flour: heavy and light filth.
RODRIGUES, R.M.M.S.; SANTOS, M.C & ZAMBONI, C.Q..... 245-249
- 687 *Determinação de amido em salsichas: comparação entre os métodos de Fehling e de Somogyi-Nelson e avaliação de metodologia para extração do amido.*
Starch determination in sausages (hot dogs): comparison between the Fehling and Somogyi-Nelson methods and valuation of methodology for starch extraction.
AUED, S.; CARVALHO, J.B.; TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M. & BACETTI, L.B.... 251-256
- 688 *Beta-caroteno, urucum e cúrcuma em massas alimentícias vitaminadas com ovos.*
Beta-carotene, annatto and turmeric in egg-added flour foods.
TAKAHASHI, M.Y.; INOMATA, E.I.; YABIKU, H.Y. & GIANNATTASIO, C.M.P..... 257-260
- 689 *Cytological, cytochemical and immunological findings from two children with Chediak-Higashi syndrome.*
Estudo citológico, citocímico e imunológico de duas crianças com síndrome de Chediak-Higashi.
CATERINO-de-ARAÚJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E. de los & CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S..... 261-267

690	<p>Frequência de anticorpos específicos para herpes simples e citomegalovírus em soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida — AIDS.</p> <p><i>Herpes simplex virus and cytomegalovirus antibodies frequency in serum and cerebrospinal fluid from patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome — AIDS.</i></p> <p>OLIVEIRA, M.I.; CURTI, S.P.; SAKUMA, M.E.; AFONSO, A.M.S.; AZEVEDO, C.V. & ANTUNES, J.L.F.....</p>	269-273
691	<p>Expressão antigênica e diferenciação morfológica de neoplasias mamárias: um estudo comparativo.</p> <p><i>Antigenic characters and morphologic differences of the mammary neoplasms: a comparative study.</i></p> <p>PESTANA, C.B. & CARDOSO-de-ALMEIDA, P.C.....</p>	275-279
692	<p>Mucoproteínas: novas contribuições para um problema laboratorial.</p> <p><i>Mucoproteins: new assessments for a laboratorial problem.</i></p> <p>MARTINS, H.P.; ZAMBONI, I.M.; YUKI, M.M. & CASTILHO, L.N.....</p>	281-283
693	<p><i>Quantification of lymphocyte subsets in AIDS associated with suspected cytomegalovirus infection.</i></p> <p>Determinação de subpopulações linfocitárias na AIDS associada com provável infecção pelo Citomegalovírus.</p> <p>CATERINO-de-ARAÚJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E. DE LOS & UEDA, M.....</p>	285-290
694	<p>Determinação de chumbo e cádmio em artigos escolares.</p> <p><i>School materials: determination of lead and cadmium.</i></p> <p>GARRIDO, N.S.; PREGNOLATTO, N.P.; MURATA, L.T.F.; SILVA, M.R.; NUNES, M.C.D.; ENGLER, V.M. & SAKUMA, A.M.....</p>	291-296
695	<p>Análise de alguns parâmetros envolvidos com o ensaio de DNA polimerase do vírus da hepatite B.</p> <p><i>Some parameters for the assay of the DNA polymerase of the hepatitis B virus.</i></p> <p>MIYAMOTO, Y. & PINHO, J.R.R.....</p>	297-299
696	<p>Métodos para detecção de sujidades leves em sopas desidratadas.</p> <p><i>Development of methods for light filth detection in powdered dehydrated soups.</i></p> <p>ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; ATUI, M.B.....</p>	301-305
697	<p>Óleo de amêndoa de palma (palmiste) brasileiro: caracterização e composição em ácidos graxos.</p> <p><i>Brazilian palm kernel oil: characterization and fatty acid composition.</i></p> <p>TAVARES, M.; BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. & AUED, S.....</p>	307-312
698	<p>Reconhecimento botânico da espécie <i>Erythrina speciosa</i> Andr. (mulungu).</p> <p><i>Botanical recognition of the species Erythrina speciosa Andr.(mulungu).</i></p> <p>JORGE, L.I.F.....</p>	313-317
699	<p>Isolamento de <i>Aspergillus</i> spp aflatoxigênicos de produtos alimentícios - São Paulo, Capital.</p> <p><i>Isolation of aflatoxigenic Aspergillus spp from food products - São Paulo, Capital.</i></p> <p>GELLI, D.S.; JAKABI, M. & PORTO, E.....</p>	319-323

AOS COLABORADORES

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos especialmente 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 PUBLICAÇÃO

Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com duplo entrelinhamento em folhas de papel tamanho ofício, com margens de 3 cm de cada um dos lados, numeradas com algarismos arábicos no ângulo superior direito. Evitar dividir as palavras no fim da linha, mesmo que a margem fique irregular, e nunca usar com este propósito barras ou sinais tipográficos para encher o espaço. No caso de ser utilizada máquina elétrica, usar a esfera de caracteres tipo redondo para o texto, reservando a esfera tipo itálico para palavras latinas ou de língua estrangeira.

No preparo do original, será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura:

Página de rosto

Título do artigo
Nome do(s) autor(es)
Filiação científica

Texto

Introdução
Material e Métodos
Resultados
Discussão
Conclusões
Agradecimentos (se for o caso)

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

TÍTULO — Deverá ser curto e específico, indicando precisamente o conteúdo do artigo; no caso de ser necessário título longo, recorrer a subtítulo.

ABREVIATURAS — Não serão empregadas nos títulos ou nos resumos. No texto, serão evitadas ou usadas apenas as oficiais, já consagradas.

UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS — Deverão ser usadas somente as unidades legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução nº 11, de 12 de outubro de 1988, do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Diário Oficial*, Brasília, 21 out. 1988. Seção 1, pt. 1, p. 20524-32. Aprova a Regulamentação Metrológica que com esta baixa e revoga a Resolução nº 01/82, de 27 de abril de 1982).

TABELAS — Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelo respectivo título, que deverá indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não deverão ser repetidos em gráfico, a não ser em casos especiais. Na montagem das tabelas, seguir as normas brasileiras para apresentação tabular (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA — Normas de apresentação tabular. Rio de Janeiro, IBGE, 1979. 22 p.).

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 do dado; |
| 0,0 | quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir 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 deverão ser identificadas com: número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; deverão ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de até 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade; as respectivas legendas deverão estar escritas fora da área de reprodução.

Os gráficos, mapas, desenhos deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal, com letras e números escritos com nomógrafo.

As fotografias deverão ser nítidas e de bom contraste. No caso de diapositivos, estes deverão ser apresentados e não fotografias dos mesmos.

RESUMOS — Serão apresentados um em português, antecedendo o texto, outro em inglês (encabeçado pelo título do artigo), no final, antes das referências bibliográficas. Não deverão exceder 200 palavras. O estilo será claro e conciso, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos observados e os elementos novos essenciais à conclusão. Serão redigidos pelo próprio autor ou com a colaboração deste, observando-se recomendações da UNESCO (*Bol. UNESCO, Bibl.23: 72-7, 1969*). A fim de facilitar a indexação, o resumo deverá conter:

Descritores — Palavras ou expressões que indenticam o conteúdo do artigo. Os três principais *descritores* serão escritos em primeiro lugar, por ordem de importância. Recomenda-se para a escolha dos descritores usar o vocabulário próprio do campo especializado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — Deverão ser mencionadas somente as de trabalhos consultados diretamente ligados ao assunto.

No texto — Serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, e escritas em versal; assim, para um autor... TAUNAY³¹ verificou...; para dois autores... LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando...; para mais de dois autores: No trabalho de TSUNODA *et alii*⁶; ou ainda... segundo vários autores^{1,3,7,8}.

Na lista de referências — Terão numeração consecutiva e serão ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral). Todos os autores do artigo deverão ser citados.

Para artigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico abreviado (*WORLD list of scientific periodicals, published in the years 1900-1960; edited by Peter Brown and George Burder Stratton. 4. ed. London, Butterworths 1963-1965, 3 v.*) em grifo, nº do volume, nº do fascículo (quando a numeração não for continuada), páginas inicial e final do artigo, data publicação do volume de fascículo.

Ex.:

MORENO, G.; LOPES, C.A.M.; BELLOUMINI, H.E.; PESSOA, G.V.A.; BIASI, P. & ANDRADE, J.C.R. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 15:122-126, 1973.

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra (em grifo), nº da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, nº de páginas, ou volumes (ou nº da página consultada).

Ex.:

CANTAROW, A. & SHEPARTZ, B. - *Bioquímica*. 3ª ed. Guanabara, Atheneu, 1968. p. 325.

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor alterações do original. Este original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de recebimento, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 50 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. 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, na conformidade da legislação sobre Direitos Autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

A *Revista do Instituto Adolfo Lutz* é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta com periódicos nacionais ou estrangeiros.

ENHANCED SENSITIVITY OF DOT-IMMUNOBINDING ASSAYS
FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES IN MICE BY THE USE OF
MILD DETERGENT EXTRACTED *TRYPANOSOMA CRUZI*
ANTIGENS

Elizabeth Natal DE GASPARI*
Ana Maria S. STOLF**
Ises A. ABRAHAMSOHN

RIALA 6/683

DE GASPARI E. N.; STOLF A.M.S. & ABRAHAMSOHN, I.A. — Enhanced sensitivity of dot-immunobinding assays for the detection of antibodies in mice by the use of mild detergent extracted *Trypanosoma cruzi* antigens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 231-233, 1990.

ABSTRACT: A method for a rapid and accurate demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using nitrocellulose paper strips with antigens of the parasite was developed and evaluated. We report herein additional advantages of its use for the detection of specific antibody to *Trypanosoma cruzi* in the sera of mice. Increased sensibility without increase in the background was achieved using parasite antigens obtained by mild non-ionic detergent extraction as compared to antigens extracted by alkaline digestion.

DESCRIPTORS: *Trypanosoma cruzi*; Dot-immunobinding assays; epimastigotes; trypomastigotes; non-ionic detergent.

The dot-immunobinding assay (DI) has already proved itself to be a convenient and rapid serodiagnostic technique for the detection of antibodies against protozoa in human serum^{1,2,3,4}. We report, herein, additional advantages of its use for the detection of specific antibody to *Trypanosoma cruzi* in the sera of mice. Increased sensitivity without increase in the background was achieved using parasite antigens obtained by mild non-ionic detergent extraction as compared to antigens extracted by alkaline digestion. Detergent extraction ensures a better preservation of antigenic molecules. Although the antigens thus prepared do not adhere to plastic surfaces and are therefore unsuitable for ELISA assays, they can be directly applied on nitrocellulose sheets without any further treatment.

C57B1/10J (B10), A/Sn, Balb/c, CBA and outbred albino mice infected (i.p) with sublethal inocula of *T. cruzi* (Y strain) blood forms. At different days after infection 100 µl samples of blood were collected from the ophtalmic plexus. Each pool of sera was obtained from 15 to 25 mice. Epimastigotes were grown in liver infusion tryptose medium and washed three times by centrifugation (600 g, 10 min., 4°C) in cold sterile 0.01M phosphate buffered saline (PBS). Tissue culture trypomastigotes grown in LLC-MK2 cell cultures were harvested from the supernatant and washed three times (1000 g, 10 min., 4°C) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Flow Labs. Inc., Rockville, MD). Alkaline digestion (0.15M NaOH) of pelleted epimastigotes was carried out exactly as described by

* Da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

** Do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

*** Do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

HOSHINO-SHIMIZU⁶. Detergent extraction was carried out by suspending 2×10^7 pelleted epimastigotes or trypomastigotes in 300 μ l of 0.65% (v/v) Nonidet- P40 (NP-40, Shell Química S.A., S. Paulo, Brasil) in TBS (50 mM NaCl buffered with Tris (hydroxymethyl) aminomethane 2 mM to pH. 7.5). The parasites were incubated in NP-40 for 5 min at room temperature (RT) and kept frozen at - 20°C. The three antigen preparations obtained: EPI-alkaline, EPI-NP40, and Trypo-NP40 were titrated "en bloc" against positive and negative reference sera. One microliter samples were deposited on nitrocellulose membrane strips (Bio Rad Labs. Inc., Richmond, CA) and dried at 37°C. The actual amount of antigen in 1 μ l corresponded to: 1.2×10^5 parasites for EPI-alkaline, 6.2×10^4 parasites for EPI-NP40 and 3.1×10^4 parasites for Trypo-NP40. All the next procedures were carried out at RT and all working solutions were made in TBS.

The DI assay was performed as described by LISSALDO². Briefly, the nitrocellulose sheets were blocked with 5% (w/v) skimmed milk (Molico, Nestlé do Brasil, MG, Brasil) for 2h and rinsed twice in TBS. The dilutions of the serum

samples were done in 96 well dilution plates to which the antigen dotted strips were firmly clamped and incubated for 1h on a rocking platform. The strips were rinsed in 0.05% (v/v) NP40 and covered with peroxidase labelled goat anti-mouse IgG (Cappel, Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) for 1h titre 1/500 (v/v). After rinsing in PBS, the strips were incubated in the substrate (titre 1/500 v/v) chromogen solution (Diamino-benzidine 0.01% (w/v) and 1/400 (v/v) dilution of 30% (v/v) H₂O₂, in PBS). The strips were rinsed, dried and read by visual inspection. The last serum dilution resulting in a yet discernible brown spot was considered its titre. The titres obtained for the pools of sera tested against the three different antigens were compared using the Sign test⁵. Normal mouse sera (pooled) from any of the strains used were consistently negative in dilutions as low as 1/5.

The use of NP40 extracted antigen led to an increased of sensitivity of the order of at least twice the log² titres obtained for the same sera tested against alkaline extracted antigen (Table). Thus, the better conservation of antigen structure in the presence of mild detergent extraction is a

TABELA

Dot - Immunobinding assay of antibody to alkaline and detergent extracted *T. Cruzi* antigens in infected mice.

Reciprocal titres of sera tested to antigens				
Days PI	Mouse strain	Epi-NPA40*	Epi-alkaline ⁺	Trypo-NP40 [‡]
8	A/Sn	20	5	10
	B/10	20	5	10
	Balb/c	20	20	10
11	A/Sn	80	40	160
	B10	40	20	80
	Balb/c	40	10	80
14	CBA	160	40	320
18	A/Sn	160	20	160
	B10	160/160/160§	20/20/20§	320/320/320§
	CBA	80	20	160
45-65 (Chronic phase)	ASN	320/320/640§	40/40/40§	640/320/640§
	B10	320/320/640/640§	80/40/160/160§	640/320/640/640§
	Balb/c	320/640§	40/160§	320/640§
	Outbred	640	10	640

* Epimastigote antigen obtained by detergent extraction; ⁺Epimastigote antigen obtained by alkaline extraction; [‡] Tissue culture trypomastigote antigen obtained by detergent extraction. § Each value corresponds to independent pools of sera tested, which were tabulated in the same order in any of the three columns presented above. Statistic analysis: Epi-NP40 vs. Epi-alkaline: p < 0.001 for sera from 8 to 18 days PI; p < 0.005 for chronic phase sera. Epi-NP40 vs. Trypo-NP40: p > 0.1.

major advantage of the dot assay. Moreover, the dot assay is more economical since even minute amounts of antigen are totally bound to the membrane. This investigation was supported by FAPESP and CNPq-PIDE VI to I.A.A. and to A.M.S.S. E.N. De Gaspari acknowledges her fel-

lowship from FAPESP. The authors are indebted to Drs. Yara Juliano and Neil Ferreira Novo from the Biostatistics Division of the Dept. de Medicina Preventiva, Escola Paulista de Medicina, for statistical analysis.

RIALA6/683

DE GASPARI E.N., STOLF A.M.S & ABRAHAMSOHN, I.A. — A utilização de detergente na extração de antígenos de *Trypanosoma cruzi* aumentou a sensibilidade da reação imunoenzimática (Dot-immunobinding assay), para a quantificação de anticorpos de camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 231-233, 1990.

RESUMO: Um método rápido e preciso para a demonstração de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* usando papel de nitrocelulose com antígenos do parasito foi padronizado e avaliado. Mostramos neste estudo as vantagens de sua utilização na detecção de anticorpos específicos no soro de camundongos. Observamos aumento da sensibilidade sem aumento da inespecificidade utilizando-se antígenos do parasito tratado com detergente não iônico.

DESCRITORES: *Trypanosoma cruzi*, reação imunoenzimática, epimastigota, tripomastigota, detergente não iônico.

REFERENCES

1. ARAÚJO, F.G. — A method for demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using antigen coated nitrocellulose paper strips. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 242-245, 1985.
2. LISSALDO, A.M.; STOLF, A.M.S.; HOSHINO SHIMIZU, S. & CAMARGO, M.E. - Padronização da técnica de imunodot para sorologia da doença de Chagas. In: Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 12^o, Caxambu, 1986. *Proceedings*. Caxambu, Minas Gerais, 1986. p. 99.
3. PAPPAS, M.G.; HAYKOWSKI, R.; HACKMEYER, W.T. — Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral Leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 64: 205-214, 1983.
4. PAPPAS, M.G.; HAYKOWSKI, R.; TANG, D.B & HOCKMEYER, W.T. — Reduced false positive reactions in the Dot-enzyme linked immunosorbent assay for human visceral leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 34: 392-396, 1985.
5. SIEGEL, A.— Nonparametric statistics for the behavioural sciences. Tokyo, Kokakusha, 1985. p. 68-74.
6. SHIMIZU, S.H.; CAMARGO, M.E. & NAGASSE, T.K.— A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 20: 208- 12, 1978.

Recebido para publicação em 8 de janeiro de 1990.



PIROGENICIDADE DE SOLUÇÕES DE GRANDE VOLUME PARA USO ENDOVENOSO*

Walter ALVES**
Otilia Ferreira NOVO**
Ileana E.M. da FONSECA**
Helena Ide ALVES**

RIALA6/684

ALVES, W.; NOVO, O.F.; FONSECA, I.E.M. & ALVES, H.I. - Pirogenicidade de soluções de grande volume para uso endovenoso*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 235-238, 1990.

RESUMO: Foram estudadas 352 amostras de soluções de grande volume compreendendo soluções de: glicose a 5%, fisiológica, glicofisiológica, Ringer, Ringer com lactato e manitol. Tais soluções foram analisadas quanto à presença de pirogênio nas mesmas. Destas soluções, 67 estavam impróprias para utilização por apresentarem pirogênio com a agravante de que 27 dessas amostras estavam contaminadas com crescimento evidente de fungos e bolores.

DESCRITORES: Soluções de grande volume, uso endovenoso, bactérias Gram negativas, endotoxinas, pirogênio.

INTRODUÇÃO

Inoculações endovenosas de endotoxina de bactérias Gram negativas, em quantidade de microgramas produzem o efeito fisiopatológico de produção de febre ou pirogenicidade. As bactérias Gram negativas produzem endotoxinas, ou seja, lipopolissacarídeos complexos dispostos nas paredes celulares e liberadas pela lise das células bacterianas quando da esterilização^{4,5,6,8,9}.

Alguns autores atribuem a toxicidade da endotoxina ao lipóide A isolado do complexo, porém o mais provável é que todo o complexo de peso molecular elevado variando entre 100.000 e 900.000 daltons seja o causador dos efeitos tóxicos, entre os quais a pirogenicidade^{1,2,7,9,10,11}.

Quando a toxina penetra no organismo de mamíferos (homem, coelho) é depurada pelo sistema retículo endotelial, sendo absorvida pelos leucócitos circulantes.

Para inativação de endotoxina também contribuem fatores séricos e os esteróides das supra-renais.

Após a injeção de uma solução contendo pirogênio em um paciente ou em um coelho, existe um intervalo de latência de 30 ou mais minutos seguido de pequena elevação de temperatura. Nesse período há uma diminuição dos leucócitos polimorfos nucleares circulantes, após o que teremos uma elevação maior e duradoura da temperatura, cuja causa provável é a liberação do "pirogênio endógeno" dos leucócitos do sangue pela ação do "pirogênio exógeno" de bactérias Gram negativas que foi inoculado.

Pacientes com problemas cárdio-respiratórios tornam-se de alto risco quando recebem inoculações endovenosas de fármacos e medicamentos contendo pirogênio, que provocarão febre ou aumentarão a já existente.

* Realizado na Seção de Controle de Esterilidade e Pirogênio e na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Essas soluções de grande volume analisadas são soluções de grande importância na rotina hospitalar, visto que na grande maioria das vezes são emergenciais, utilizadas para manter o volume do sistema circulatório, o equilíbrio eletrolítico do sangue, como também na alimentação energética por via venosa. Daí a preocupação constante com o controle de boas normas de qualidade de tais produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Estufa de despirogenação — 250° C
 Seringas e agulhas despirogenadas
 Frascos Erlenmeyer, balões volumétricos, béqueres despirogenados
 Termômetro de leitura instantânea, com dois satélites e dez terminais em cada um.
 Coelhos sadios com + ou - 1,800 g
 Gaiolas com guilhotina para testes.

No presente trabalho foram analisadas 352 amostras de soluções de grande volume endovenosas, remetidas ao Instituto Adolfo Lutz pelo Centro de Vigilância Sanitária, além de amostras encaminhadas pelos próprios laboratórios particulares.

As amostras eram procedentes dos nove principais laboratórios especializados em soluções de grandes volumes (laboratórios I a IX) que abastecem a rede hospitalar de São Paulo.

As amostras analisadas foram as seguintes:

Solução Fisiológica 0,9% — 102 amostras
 Solução Glicofisiológica — 64 amostras
 Solução de Glicose 5% — 148 amostras
 Solução de Ringer — 10 amostras
 Solução de Ringer com lactato — 18 amostras
 Solução de manitol — 10 amostras

Procedimento

As amostras foram verificadas quanto ao controle de pirogênio de acordo com a metodologia oficial descrita na Farmacopéia Brasileira 3ª edição³.

Os coelhos adaptados ao biotério de teste foram usados num primeiro teste em número de três. Se o resultado fosse duvidoso, de acordo com os índices oficiais, o teste era repetido com mais cinco coelhos. Os terminais dos satélites do termômetro de leitura instantânea foram introduzidos no reto dos animais, presos nas gaiolas guilhotinadas para teste, à profundidade de 7,5 cm. Quarenta minutos antes de iniciar os testes,

TABELA 1

Análises de Controle de Pirogênio em Soluções de Grandes Volumes

Laboratórios	Solução Fisiológica 0,9%		Solução Glicofisiológica		Solução de Glicose 5%		Solução de Ringer		Solução de Ringer com Lactato		Solução de Manitol	
	Analisadas	Condenadas	Analisadas	Condenadas	Analisadas	Condenadas	Analisadas	Condenadas	Analisadas	Condenadas	Analisadas	Condenadas
I	20	6**	9	3*	30	4***	2	1	5	-	3	-
II	25	5**	10	5***	37	8***	2	-	3	-	-	-
III	10	-	7	-	18	2**	-	-	3	-	-	-
IV	10	-	7	2	10	-	-	-	-	-	-	-
V	10	3*	6	-	13	5**	-	-	5	2	4	-
VI	7	2*	5	2*	15	3*	-	-	-	-	-	-
VII	5	1*	7	1	13	2*	3	1	-	-	-	-
VIII	5	-	8	2*	5	1	1	-	-	-	-	-
IX	10	1	5	-	7	4***	2	1	2	-	3	-
Total	102	18	64	15	148	29	10	3	18	2	10	-

* (1 amostra com crescimento evidente de fungos)
 ** (2 amostras com crescimento evidente de fungos)
 *** (3 amostras com crescimento evidente de fungos)

as temperaturas foram anotadas e consideradas como temperaturas controle. Antes de inocular os coelhos, medimos novamente as temperaturas e só foram considerados animais cuja variação de temperatura não foi maior que 0,6°C em relação ao controle e animais que apresentavam temperaturas normais, ou seja, de 38,9°C a 39,8°C.

Os produtos foram inoculados de acordo com suas respectivas monografias especificadas na Farmacopéia Americana, USP XXI ed¹.

RESULTADOS

Das 352 amostras analisadas, 67 apresentaram pirogênio em desacordo com as normas oficiais vigentes. Portanto, 19,03% das amostras estavam em condições impróprias para consumo, com agravante de que 27 dessas amostras, ou seja 7,67% já se apresentavam contaminadas, com crescimento evidente de fungos e bolores.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em termos de Saúde Pública, da população que necessita da transfusão destes produtos em emergências hospitalares, os resultados obtidos são bastante preocupantes, visto que, de cada 1.000 pacientes que necessitam de soluções endovenosas de grande volume, mais de 190 terão seus estados clínicos agravados pela medicação, caso não seja realizado um controle de qualidade que evidencie os produtos impróprios para uso.

Temos ainda que levar em consideração os produtos que se apresentam com contaminação evidente por fungos e bactérias. Tais produtos, por sua própria apresentação, não podem ser aplicados para evitar casos de septicemia.

A conclusão do presente trabalho é firmar a exigência de um efetivo controle de garantia de qualidade nessas soluções de grandes volumes antes de serem colocadas à disposição dos hospitais.

RIALAG/684

ALVES, W.; NOVO, O.F.; FONSECA, I.E.M. & ALVES, H.I. — Pirogenicity of large volume endovenous solutions. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 235-238, 1990.

ABSTRACT: There were studied 352 samples of large volume solutions of dextrose 5%, physiological saline, dextrose and sodium chloride, Ringer, Ringer lactated and mannitol. These solutions were tested as for the presence of pyrogen., wich was found in 67 samples. In 27 solutions there was evident growth of fungi and moulds.

DESCRIPTORS: Large volume endovenous solutions, Gram negative bacteria, endotoxins, pyrogen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EDMONDSON, E.B. & SANFORD, J.P. — The *Klebsiella enterobacter serratia* group, *Medicine*, 46: 323-340, 1967.
2. EDWARDS, P.P. & EWING, W.H. - *Identification of Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minncapolis, Burges, 1972. p. 362.
3. FARMACOPÉIA brasileira. 3^a ed. São Paulo, Andrei, 1977. p. 964-70.
4. ERNEST, R.R. — Sterilization by heat. In: BLOCK, S.S. ed. - *Disinfection, sterilization and preservation*. 2nd ed. Philadelphia, Lea 1977. p. 481-521.
5. PERKINS, J.J. — Bacteriological and surgical sterilization by heat, In: REDDISH, F.G. ED. — *Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization*. Philadelphia, Lea 1954. p. 655-719.
6. SCHIMIDT, F.C. - Thermal resistance of microorganism, In: REDDISH, F.G. ed. — *Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization*. Philadelphia, Lea, 1954. p. 720-59.
7. SHECHMEISTE, L. — Sterilization by ultraviolet radiations. In: BLOCK, S.S., ed. — *Disinfection, esterilization and preservation*. 2nd ed. Philadelphia, Lea, 1977. p. 522-541.
8. SILVERMAN, J.G. & SINSKEY, G.A. - Sterilization by ionizing irradiation. In: BLOCK, S.S., ed. — *Disinfection, sterilization and preservation*. 2nd ed. Philadelphia, Lea, 1977. p. 542-561.

9. SMITH, H.N. & HALL, S. — *Studies on Escherichia coli enterotoxin*. *J. Path. Bact.* 8: 531-543, 1967.
10. SYKES, G. - The phenomenon of bacterial survival. *J.appl. Bact.* 26: 287-97, 1963.
11. UNITED STATES Pharmacopeia. 21^a ed. Rockville, Md., USP, 1985. p. 617-18, 944-46, 1137-138, 1181-182, 1406.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.

SUCOS DE MARACUJÁ, TAMARINDO E UVA: MÉTODOS DE ANÁLISE DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICAS.*

Marlene Correia dos SANTOS**
Regina Maria M.S RODRIGUES**
Claydes de Quadros ZAMBONI**

RIALA6/685

SANTOS, M.C.; RODRIGUES, R.M.M.S. & ZAMBONI, C. Q. — Sucos de maracujá, tamarindo e uva: métodos de análise das condições higiênicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 239-243, 1990.

RESUMO: Foi desenvolvido um método de análise das condições higiênicas de sucos de maracujá e tamarindo, utilizando-se a extração com frasco armadilha de Wildman, a tamisação e a filtração em papéis de filtro branco e azul. A utilização de papel de filtro branco favoreceu a visualização de fragmentos de insetos e o azul facilitou a identificação de larvas e ovos de insetos. O método mostrou-se eficiente por detectar fragmentos, ovos e larvas de insetos em uma única técnica de análise; usar materiais e reagentes disponíveis em laboratório e apresentar boa reprodutibilidade. Para suco de uva foi utilizado o método de filtração direta em papel de filtro branco. Foram analisadas 76 amostras dos sucos citados. Os sucos de maracujá e de uva estavam em condições higiênicas satisfatórias. As amostras de suco de tamarindo apresentaram contaminação com número elevado de fragmentos de insetos, além de ovos e de larvas.

DESCRIPTORIOS: maracujá, tamarindo, uva, suco de, condições higiênicas de sucos.

INTRODUÇÃO

As frutas constituem matérias-primas de importância na alimentação do brasileiro, tanto na forma "in natura" como na processada.

A qualidade e a vida útil de um produto alimentício, como os sucos industrializados, estão intimamente relacionadas com as condições da matéria-prima, transporte, processamento e embalagem².

Segundo Rocha³, parte da produção nacional de frutas é perdida principalmente após a colheita, por falta de tratamento e manuseio adequados, susceptibilidade ao ataque das pragas e microorganismos e inadequação na estocagem.

Considerando que as frutas estão sujeitas à contaminação por pragas, em todas as etapas de transformação em um produto industrializado⁴, a

presença de matérias estranhas, como fragmentos, larvas e ovos de insetos, é esperada.

Na cidade de São Paulo, o consumo de sucos industrializados é grande, com a oferta de sucos de várias frutas e de diversas marcas. Apesar disso, não se tem um método de análise padronizado para detecção microscópica das condições higiênicas desse produto.

Baseado nas técnicas descritas na A.O.A.C.¹, foi desenvolvido um método para detecção de fragmentos, larvas e ovos de insetos, para sucos de maracujá, tamarindo e uva.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra-padrão de suco de maracujá contaminada com dez ovos, dez larvas e dez asas de *Drosophila sp.*

* Realizado no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Amostras de diferentes procedências adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, assim distribuídas: 27 sucos de maracujá, de nove marcas diferentes, 20 sucos de tamarindo, de duas marcas, e 29 sucos de uva de dez marcas comerciais.

Método A

Método baseado na "Association of Official Analytical Chemists"¹.

Material

Béquer de 250 ml
Papel de filtro de filtração média branco
Papel de filtro de filtração média azul, tingido com cristal violeta 0,1%
Tecido de nylon para filtração 10 XX (abertura de malha 132 μ) branco
Tecido de nylon para filtração 10 XX azul, tingido com tinta para tecido Acrilex (1:10)
Tecido de nylon para filtração 17 XX (abertura de malha 80 μ) branco.
Tecido de nylon para filtração 17 XX azul, tingido com tinta para tecido Acrilex (1:10)
Equipamento para filtração a vácuo
Microscópio estereoscópico

Procedimento

Pesar 100g da amostra-padrão e filtrar a vácuo, utilizando papéis de filtro e tecidos de nylon 10 XX e 17 XX, brancos e azuis.

Examinar o material ao microscópio estereoscópico (20 x).

Método B

Método de extração e tamisação para sucos de maracujá e tamarindo.

Material

Béquer de 250 ml
Frasco armadilha de Wildman de 2.000 ml
Tamis USBS n^o 140
Papéis de filtro e tecidos de nylon de acordo com o descrito no *Método A*
Equipamento para filtração a vácuo
Microscópio estereoscópico

Reagentes

n-heptano
Água à temperatura de 70°C

Procedimento

a — Extração

Pesar 100 g de amostra de suco homogeneiza-

do, em frasco armadilha de Wildman, juntar 15 ml de n-heptano e agitar bem. Adicionar água quente (70°C) até encher o frasco.

Agitar o êmbolo do frasco, ocasionalmente, durante 20 minutos, deixar o líquido em repouso por dez minutos e extrair o material para um béquer, lavando o gargalo do frasco com água quente para remover o material aderido em suas paredes e na haste.

Adicionar 15 ml de n-heptano, completar o volume do frasco com água quente (70°C), agitar, repetir o tempo de extração e extrair novamente o material para um béquer.

Filtrar a vácuo sobre papel de filtro branco e examinar o material ao microscópio estereoscópico (20 x).

b — Tamisação

Passar o resíduo do frasco de Wildman para um tamis n^o 140, lavando-o com jatos de água. Filtrar o material retido no tamis, a vácuo, lavando-o com água filtrada para retirar todo o material aderido. Examinar o material ao microscópio estereoscópico (20 x).

Método C

Método de filtração direta para suco de uva.

Material

Béquer de 250 ml
Papel de filtro de filtração média branco
Equipamento para filtração a vácuo
Microscópio estereoscópico

Procedimento

Pesar 100g de suco de uva homogeneizado e filtrar a vácuo sobre papel de filtro. Examinar o material ao microscópio estereoscópico (20 x).

RESULTADOS

Na tabela 1, estão os resultados obtidos na recuperação de fragmentos, larvas e ovos de insetos, utilizando-se papel de filtro e tecidos 10 XX e 17 XX, brancos e azuis. Os números indicam a média, em porcentagem, de dez análises, utilizando-se a amostra-padrão de suco de maracujá contaminado com dez fragmentos, dez larvas e dez ovos de *Drosophila sp* (para cada 100 g de amostra) e o método B.

Os resultados obtidos na análise das 76 amostras de sucos de uva, maracujá e tamarindo estão apresentados na tabela 2.

TABELA 1

Média, em porcentagem, de recuperação de matérias estranhas, em amostra padrão de suco de maracujá

Matérias estranhas	Recuperação (%)						Média
	Papel filtro		Tecido 10 XX		Tecido 17 XX		
	branco	azul	branco	azul	branco	azul	
Fragmentos de insetos	100	100	100	100	100	100	100
Larvas	90	100	95	100	100	100	97,5
Ovos	70	90	60	75	75	80	75

Para testar a reprodutibilidade dos métodos utilizados, quanto a fragmentos, larvas e ovos de insetos, 30 das 76 amostras dos sucos de uva, maracujá e tamarindo foram analisados em duplicata: duas frações (amostras 1 e 2) de 100 g cada uma foram contaminadas com dez asas, dez ovos e dez larvas de *Drosophila sp.* A média das duplicatas, a média aritmética e o coeficiente de variação para ovos e larvas estão na tabela 3.

DISCUSSÃO

a — Dos métodos

Inicialmente, usando-se o método A com amostra-padrão de suco de maracujá, em frações de 100 g contaminadas com ovos, larvas e asas de *Drosophila sp.*, testou-se a filtração direta, da amostra, em papel de filtro e tecidos de nylon para filtração 10 XX e 17 XX, brancos e azuis.

O tecido 10 XX foi testado por ser indicado no método de filtração da A.O.A.C.¹, para ovos e larvas de insetos. Por ser importado, testou-se o tecido nacional 17 XX, cuja abertura de malha é a mais próxima à do 10 XX. Não foi encontrado nos fornecedores nacionais de tecido de filtração um com abertura igual ao importado.

Tanto para o papel de filtro como para os tecidos de nylon, foram necessárias cerca de cinco filtrações por amostra, tornando difícil e demorada a leitura para o analista.

O número elevado de filtrações por amostra é consequência da alta concentração de sólidos em suspensão no suco, exigido pela legislação em vigor⁵, ou seja, a amostra de suco apresenta grande quantidade de elementos histológicos da fruta.

Para diminuir o número de filtrações por amostra e o tempo gasto na pesquisa, concomi-

tante, de fragmentos de insetos e de ovos e larvas de insetos, procurou-se eliminar os elementos histológicos da fruta presentes na filtração. Assim, para a pesquisa de fragmentos de insetos, utilizou-se a extração do material com o frasco armadilha de Wildman e, para a recuperação de ovos e larvas de insetos, a tamisação do resíduo do frasco. Desta forma, foi possível reduzir o número de filtração por amostra para duas: uma para o material de extração do frasco e outra para o material retido no tamis. Em ambas as filtrações testou-se o papel de filtro e os tecidos 10 XX e 17 XX, brancos e azuis.

Observou-se que o papel de filtro e tecidos brancos favoreceram a visualização dos fragmentos de insetos, por serem de cor marrom, enquanto o papel de filtro e tecidos azuis facilitaram a identificação de larvas e ovos de insetos, por serem brancos ou amarelados e pequenos, ficando camuflados pelos elementos histológicos do fruto.

A análise das condições higiênicas de suco de uva é facilitada pela ausência de elementos histológicos de uva na amostra, pois na tecnologia de processamento da fruta obtém-se baixa concentração de sólidos em suspensão⁵. Desta forma, é possível a filtração direta da amostra em papel de filtro branco (método C) e a fácil visualização de fragmentos, larvas e ovos de insetos, quando o material é examinado ao microscópio estereoscópico.

b — Dos resultados

Analisando a tabela 1, observa-se que a porcentagem de recuperação para fragmentos de insetos foi de 100% em todas as filtrações; para larvas, obteve-se 97,5% e, para ovos, 75% de recuperação. Para larvas e ovos, a porcentagem de recuperação foi maior quando as filtrações foram feitas em papéis e tecidos azuis. Isto porque o fundo azul facilita a visualização das larvas e ovos no exame ao microscópio estereoscópico.

TABELA 2

Matérias estranhas pesquisadas em suco de uva, maracujá e tamarindo

Matérias estranhas	Suco de uva		Suco de maracujá		Suco de tamarindo		
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	
	0	15	51,7	5	18,5	0	0,0
Fragmentos de insetos	1-10	14	48,3	21	77,8	0	0,0
	11-20	0	0,0	1	3,7	0	0,0
	21-30	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	31-40	0	0,0	0	0,0	3	15,0
	41-100	0	0,0	0	0,0	4	20,0
	101-300	0	0,0	0	0,0	13	65,0
Total		29		27		20	
Larvas	0	29	100,0	27	100,0	16	80,0
	1-10	0	0,0	0	0,0	4	20,0
Total		29		27		20	
Ovos	0	29	100,0	27	100,0	17	85,0
	1-10	0	0,0	0	0,0	3	15,0
Total		29		27		20	

TABELA 3

Reprodutibilidade dos métodos quanto a ovos e larvas de insetos

Amostras	Suco de uva		Suco de maracujá		Suco de tamarindo	
	ovo	larva	ovo	larva	ovo	larva
1	9,0	8,5	6,0	9,5	7,0	8,5
2	9,5	9,0	8,5	9,0	9,0	10,0
3	10,0	8,5	8,0	9,0	7,5	9,0
4	9,0	9,5	6,5	9,0	5,5	10,0
5	8,0	9,5	9,5	9,5	7,5	9,5
6	9,0	10,0	7,0	9,5	6,5	9,5
7	6,5	10,0	7,0	9,0	9,0	8,5
8	7,5	10,0	8,0	10,0	7,0	10,0
9	10,0	10,0	6,5	9,0	7,0	8,5
10	8,5	10,0	6,0	9,5	7,5	8,0
Média	8,7	9,5	7,3	9,3	7,3	9,2
C.V.	12%	6,22%	13,69%	3,5%	13,69%	7,73%

C.V. — coeficiente de variação

Como o papel de filtro é de fácil aquisição e de uso mais comum no laboratório, ele foi escolhido para a padronização do método de extração e tamisação, para sucos de maracujá e tamarindo (método B). Como a filtração do material de extração do frasco de Wildman é para pesquisa de fragmentos de insetos, cuja cor é marrom, usou-se papel de filtro branco. O papel de filtro azul foi usado para a filtração do material retido no tamis, cuja finalidade é pesquisar larvas e ovos.

Pela tabela 2, observa-se que 51,7% das

amostras de suco de uva e 18,5% de maracujá estavam isentas de matérias estranhas.

Nos sucos de uva, 48,3% das amostras contêm até dez fragmentos de insetos e 81,5% das amostras de suco de maracujá apresentaram contaminação por fragmentos de insetos em número inferior a 20.

Para suco de tamarindo, foram analisadas amostras de apenas duas marcas (as únicas comercializadas na cidade). Observa-se (tabela 2) uma

alta porcentagem de contaminação por fragmentos de insetos: com 35% das amostras apresentando de 31 a 100 fragmentos de insetos e 65% contendo de 101 a 300 fragmentos.

Das 20 amostras de tamarindo 20% continham larvas e 15%, ovos de insetos. O alto índice de matérias estranhas indica as péssimas condições higiênicas do produto.

Quanto à reprodutibilidade dos métodos utilizados, obteve-se na pesquisa de fragmentos de insetos 100% de reprodutibilidade. Na recuperação dos ovos e larvas de insetos obteve-se um mesmo padrão de comportamento para recuperação de ovos, independente do tipo de suco. Para larvas, obtiveram-se melhores resultados no suco de maracujá e padrões semelhantes para os outros dois sucos. Porém, verifica-se que o método foi mais eficiente para recuperação de larvas do que de ovos, talvez devido à maior fragilidade deste em relação às larvas (tabela 3).

CONCLUSÃO

O método desenvolvido para análise das condições higiênicas de sucos de maracujá e tamarindo mostrou-se eficiente por: detectar fragmentos,

ovos e larvas de insetos em 100g de amostra, utilizando, também, o resíduo de suco que permanece no frasco de Wildman após a extração; usar dois papéis para filtração, um para extração e um para o resíduo; reduzir o tempo de análise; usar materiais e reagentes disponíveis em laboratório de Microscopia Alimentar e apresentar boa reprodutibilidade.

A utilização de papel de filtro de cor azul, contrastando com o material, facilitou a visualização e auxiliou a identificação das larvas e, principalmente, dos ovos de insetos.

A análise das condições higiênicas de suco de uva foi facilitada pela ausência de elementos histológicos da fruta e pela própria cor do suco, que escurece o papel de filtro.

Os sucos de maracujá e de uva estavam em condições higiênicas satisfatórias, contendo nenhum ou pequeno número de fragmentos de insetos.

A contaminação do suco de tamarindo com grande número de fragmentos de insetos, além de ovos e larvas, colocou-o em condições higiênicas insatisfatórias, além de sugerir a necessidade de controle desses produtos e de estabelecer métodos para uso efetivo nesse controle.

RIALA6/685

SANTOS, M.C. dos; RODRIGUES, R.M.M.S. & ZAMBONI, C. DE Q. — Passiflora fruit, tamarind and grape juices: methods for determination of sanitary quality. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 239-243, 1990.

ABSTRACT: A method for detection of light filth, fly eggs and maggots in fruit juices was developed. For passiflora fruit and tamarind juices trap flasks, n° 140 sieves and filtration with white and blue filter papers were used. For grape juice direct filtration was employed. In 76 samples of these juices the examination for sanitary quality was performed. In samples of passiflora fruit and grape juices a few insect fragments were found while in the samples of tamarind juice there were many insect fragments besides maggots and eggs.

DESCRIPTORS: passiflora, tamarind, grape, fruit juices, filth microscopical analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984, p. 908 (Tecn. 44.095 e 44.096).
2. JACKIX, M.H. — Doces. In: VAN'DENDER, A. G. F. et al. — *Armazenamento de gêneros e produtos alimentícios*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, s.d. p. 67-103.
3. ROCHA, J.L.V. & SPAGNOL, W.A. — Frutas e hortaliças. In: VAN'DENDER, A. G. F. et al. — *Armazenamento de gêneros e produtos alimentícios*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, s.d. p. 227-70.
4. SANTOS, M.C. & ZAMBONI, C. Q. — Avaliação microscópica das condições higiênicas de extrato e purê de tomate e de catchup. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48 (1/2): 69-73, 1988.
5. SÃO PAULO: Leis e decretos etc. — Decreto n° 12.486 de 20 de outubro de 1978, *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de out. 1978, p. 194-97 (NTA 23). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.

Recebido para publicação em 28 de setembro de 1989.

FARINHA DE ROSCA: MATÉRIAS ESTRANHAS PESADAS E LEVES*

Regina M. M. Silva RODRIGUES**

Marlene C. dos SANTOS**

Claydes de Quadros ZAMBONI**

RIALA6/686

RODRIGUES, R.M.M.S.; SANTOS, M.C.; ZAMBONI, C.Q. — Farinha de rosca: matérias estranhas pesadas e leves. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 245-249, 1990.

RESUMO: Foram analisadas 68 amostras de farinha de rosca, 34 produzidas em padarias e 34 industrializadas, para pesquisa de matérias estranhas pesadas (partícula metálica e areia) e leves (inseto e pêlo de roedor). O método utilizado para pesquisa de matéria estranha pesada foi uma modificação do inscrito na A.O.A.C., usando-se funil de separação para sedimentação do material pesado, facilitando a identificação e a quantificação das partículas metálicas e grãos de areia. Concluiu-se que as amostras de farinhas de rosca apresentaram alto grau de contaminação com partículas metálicas, 94,1% para amostras de padaria e 91,2% para as industrializadas, enquanto 13,2% das amostras analisadas apresentaram contaminação com areia. Para pesquisa de matéria estranha leve foi utilizado o método de hidrólise ácida. Verificou-se que, quanto a fragmentos de insetos, 47,1% das amostras de padaria e 44,1% das industrializadas estavam em condições higiênicas insatisfatórias, enquanto 14,7% das farinhas de rosca de padaria e 5,8% das amostras de indústrias estavam impróprias para o consumo por conter pêlo de roedor, de acordo com a legislação em vigor.

DESCRITORES: farinha de rosca, matéria estranha pesada e leve, partícula metálica e areia, inseto e pêlo de roedor, detecção microscópica de.

INTRODUÇÃO

A farinha de rosca é o produto obtido pela moagem de pães e de roscas torradas, em perfeito estado de conservação^{4,9}. Pela própria definição, a farinha de rosca pode ser produzida tanto a nível doméstico, como em pequena escala, em padarias, e a nível industrial.

A facilidade de produzir farinha de rosca torna-a um produto sujeito a processamentos inadequados, sem controle sanitário efetivo. Apesar do processamento comercial do pão ter sido submetido à mecanização e vários melhoramentos⁷, ainda são usadas formas rudimentares na sua elaboração, em muitas padarias.

A melhora na qualidade dos produtos de pani-

ficação e nas suas condições higiênicas dependem de muitos fatores, tais como: aquisição, distribuição e conservação dos equipamentos, conservação geral do estabelecimento, higiene, controle da matéria-prima, condições de estocagem, área de produção, controle de contaminação microbiológica, de insetos e de roedores⁸.

Uma vez que a matéria-prima para produção dos produtos de panificação consiste basicamente de material moído e que estes podem conter matérias estranhas, deve-se evitar a incorporação de outras matérias estranhas em cada etapa do processamento.

A estocagem do pão, os resíduos deixados nos equipamentos, sujeiras do chão e suspensas no ar contribuem para a presença de insetos e seus

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

fragmentos, pêlos de roedor e areia no produto final. A presença de fragmentos de insetos e de pêlos de roedor foi constatada anteriormente, no estudo comparativo de métodos para extração de matérias estranhas leves em farinha de rosca¹³.

A moagem do pão em equipamentos gastos e o uso de pães com farinhas provenientes de moinhos com maquinarias velhas e que não usam eletroímã¹¹ resultam em farinhas de rosca contaminadas com partículas metálicas.

Os problemas de contaminação da farinha de rosca devem ser evitados pela indústria de panificação e controlados tanto pela indústria como pelos laboratórios de Saúde Pública.

O objetivo deste trabalho foi a modificação de metodologia para separação de matérias estranhas pesadas (partícula metálica e areia) misturadas ao produto e verificação das condições higiênicas, pela separação de matérias estranhas leves, das farinhas de rosca produzidas em padarias e em indústrias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 68 amostras de farinha de rosca, sendo 34 amostras elaboradas em padarias e adquiridas em 19 panificadoras e 34 amostras industrializadas, de 13 marcas diferentes, todas obtidas em estabelecimentos comerciais da cidade de São Paulo.

Métodos

a - Pesquisa de matérias estranhas pesadas

O método utilizado para separar matérias estranhas pesadas da amostra baseou-se no princípio da sedimentação por diferença de densidade, segundo a A.O.A.C.^{1,2}, com as seguintes modificações: menor quantidade de amostra e utilização de funil de separação.

Procedimento

Colocar 150 ml de clorofórmio em um funil de separação de 250 ml. Pesar 20 g de amostra e adicionar ao funil. Agitar o funil vigorosamente, em movimentos circulares. Agitar cuidadosamente o funil, a curtos intervalos de tempo, durante 20 minutos. Deixar em repouso por dez minutos. Após esse tempo, transferir cerca de 1/3 do volume de clorofórmio do funil diretamente para outro funil de separação de 250 ml, contendo 50 ml de clorofórmio e 50 ml de tetracloreto de car-

bono. Repetir as etapas de agitação e de sedimentação como anteriormente. Transferir cerca de 20 ml da mistura de clorofórmio e tetracloreto de carbono diretamente para um funil de vidro com papel de filtro e secar à temperatura ambiente. Examinar o material do papel de filtro ao microscópio estereoscópico, no aumento de 10x.

a.1 - Contagem de partículas metálicas

Com o auxílio de um bisturi imantado, contar as partículas metálicas. Dar o resultado em número de partículas metálicas/100 g de amostra.

a.2 - Pesquisa de areia

Após retirar as partículas metálicas, transferir o material do papel de filtro para um vidro de relógio, dissolver em água e deixar secar. Transferir os cristais de areia para um papel de filtro tarado e pesar. Dar o resultado em g%.

b - Matérias estranhas leves

Para pesquisa de insetos, larvas e seus fragmentos e pêlos de roedor, utilizou-se o método da hidrólise ácida^{3,12}. O resultado é expresso em nº /100 g de amostra.

RESULTADO

Tanto as amostras de farinha de rosca elaboradas em padaria como as de indústria foram agrupadas de acordo com a quantidade de partículas metálicas encontradas. A tabela 1 mostra o número e a porcentagem de amostras contendo ou não partículas metálicas, seguindo um critério de agrupamento em intervalo de 50, para 1 a 300 partículas metálicas, uma faixa com ausência de

TABELA 1

Partículas metálicas em farinha de rosca

Partículas metálicas	Amostras de padaria		Amostras de indústria	
	nº	%	nº	%
0	2	5,9	3	8,8
1 — 50	5	14,7	7	20,6
51 — 100	4	11,8	6	17,7
101 — 150	5	14,7	4	11,7
151 — 200	6	17,7	0	0,0
201 — 250	1	2,9	3	8,8
251 — 300	4	11,7	0	0,0
> 300	7	20,6	11	32,4
Total	34		34	

TABELA 2

Areia em farinha de rosca

Areia (g/%)	Amostra	
	n ^o	%
0	59	86,8
0,1 — 1,0	5	7,4
1,1 — 2,0	2	2,9
2,1 — 3,1	2	2,9
Total	68	

DISCUSSÃO

O método utilizado para separação de partículas metálicas e grãos de areia em farinha de rosca mostrou-se adequado pela facilidade de manipulação do funil de separação e homogeneização da amostra.

O funil de separação permite a retirada de pequena quantidade de solvente, contendo toda matéria estranha pesada e pouco tecido vegetal. Assim, o exame estereomicroscópico do material retido no papel de filtro é facilitado pela pequena quantidade de resíduo da amostra, possibilitando a rápida contagem das partículas metálicas e a averiguação dos grãos de areia.

TABELA 3

Fragmentos de insetos, larvas e pêlos de roedor em farinha de rosca (n^o/100 g)

Matérias estranhas	Farinha de rosca	Amostras de padaria		Amostras de indústria	
		n ^o	%	n ^o	%
Fragmentos de insetos	0 - 30	18	52,9	19	55,9
	31 - 60	13	38,3	8	23,5
	61 - 90	1	2,9	3	8,8
	> 90	2	5,9	4	11,8
Total		34		34	
Larvas	0	29	85,3	31	91,2
	1 - 10	5	14,7	3	8,8
	Total	34		34	
Pêlos de roedor	0	29	85,3	32	94,2
	1 - 10	5	14,7	1	2,9
	11 - 20	0	0,0	1	2,9
	Total	34		34	

No método de análise preconizado pela A.O.A.C.², para sujidades pesadas e utilizado na pesquisa de partículas metálicas em farinha de trigo¹¹, torna-se difícil a decantação das matérias estranhas pesadas, da camada de clorofórmio contendo tecido vegetal, se esta estiver muito compacta. Nestas condições de decantação podem, inclusive, ocorrer perdas do material estranho pesado devido à rapidez do movimento de verter o béquer. Por mais cuidadosa e eficiente que seja a decantação, ainda permanecem resíduos de vegetais nas paredes do béquer. Esses resíduos irão para o papel de filtro, camuflando as partículas metálicas e grãos de areia, dificultando a visualização.

Pela tabela 1, verifica-se o alto índice de farinhas de rosca contaminadas com partículas metálicas, tanto de padaria como industrializada. Somente 5,9% de farinha de rosca de padaria e 8,8% das farinhas industrializadas não continham partículas metálicas. Esses resultados indicam que tanto a farinha de trigo como o pão foram processados por maquinarias gastas, em péssimo estado de conservação. De acordo com CHATT⁶, o desgaste das máquinas é o maior responsável pela contaminação de partículas metálicas em produtos triturados.

partículas e uma com quantidade superior a 300.

Os resultados de partículas metálicas obtidos em 20 g foram calculados para 100 g de amostra.

O número de amostras de farinha de rosca contendo ou não grãos de areia é apresentado na tabela 2, em faixas de 1 g, com os resultados expressos em g%.

Os resultados obtidos na pesquisa de fragmentos de insetos, larvas e pêlos de roedor foram calculados para 100 g de amostra. Estes resultados são apresentados na tabela 3, discriminando-se os valores obtidos para amostras elaboradas em padaria e para as industrializadas.

A porcentagem de farinhas de rosca, contendo mais de 300 partículas metálicas/100 g de amostra, foi maior para as industrializadas (32,4%) do que para as de padaria (20,6%). Porém, independente do número de partículas metálicas, observa-se que as farinhas de rosca de padaria estão mais sujeitas a contaminação com partículas metálicas do que as industrializadas (Tabela 1).

Do total de amostras analisadas, 13,2% foram positivas para pesquisa de areia, sendo que a quantidade encontrada foi inferior a 3,1% do peso da amostra (Tabela 2). Embora a análise físico-química determine o teor de resíduo mineral fixo¹⁰, a quantificação dos grãos de areia na farinha de rosca foi uma tentativa preliminar de de-

envolver e adequar métodos de quantificação de material estranho por microscopia. Estudos comparativos deverão ser realizados para concluir a viabilidade do método microscópico. Ao contrário do esperado, as farinhas de rosca possuem baixo grau de contaminação por areia.

A escolha do método de hidrólise ácida³ para extração de matérias estranhas leves está fundamentada na comprovação de sua sensibilidade nos resultados obtidos em macarrão¹³.

A tolerância de até 30 fragmentos de insetos em 100 g de amostra de farinha, estipulado pela Portaria 1/86⁵, aprova 52,9% de farinhas de rosca de padaria e 55,9% de indústria (Tabela 3).

Quantidades maiores que 90 fragmentos de insetos foram encontradas em 11,8% das farinhas industrializadas e, apenas, em 5,9% das farinhas de padaria (Tabela 3).

Comparando os resultados obtidos (Tabela 3), verifica-se que a porcentagem de farinhas de rosca contaminadas foi de 14,7%, tanto para larvas como para pêlos de roedor e que apresentaram maior contaminação em relação às industrializadas.

A contaminação das farinhas de rosca com pêlos de roedor (Tabela 3) indica as péssimas condições de higiene e a necessidade de um controle mais efetivo de roedores nestes estabelecimentos.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o método para pesquisa de matéria estranha pesada foi adequado e de fácil aplicação em laboratório. O uso do funil de separação para a sedimentação facilitou a identificação e a quantificação das partículas metálicas e grãos de areia em amostras de farinha de rosca.

As farinhas de rosca apresentaram um alto grau de contaminação com partículas metálicas, 94,1% para amostras de padaria e 91,2% para industrializadas.

A pesquisa de areia foi positiva para 13,2% das amostras examinadas.

Quanto aos fragmentos de insetos, verificou-se que 47,1% das amostras de padaria e 44,1% das industrializadas estavam em condições higiênicas insatisfatórias.

Apresentaram-se impróprias para o consumo, 14,7% das amostras de padaria e 8,8% das industrializadas por conter larvas e, 14,7% das farinhas de rosca de padaria e 5,8% de indústria por conter pêlos de roedor.

As farinhas de rosca comercializadas na cidade de São Paulo necessitam de um controle mais rigoroso.

RIALA6/686

RODRIGUES, R.M.M.S.; SANTOS, M.C. & ZAMBONI, C.Q. — Surplus-bread flour: heavy and light filth. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 245-249, 1990.

ABSTRACT: A method for detection of heavy filth (ferromagnetic particles and sand) was described and used in examination of 68 samples of surplus-bread flour. Particles were found in 94,1% of bakery samples and 91,2% of industry samples. It was found that 13,2% of samples contained sand. Recovery of light filth was made by acid hydrolysis method. It was found that 91,2% of surplus-bread flour were in unsanitary conditions, while 20,5% of samples were unfit for human consumption.

DESCRIPTORS: surplus-bread flour, heavy and light filth, ferromagnetic particles, sand, insect, rodent hair, and microscopical detection in.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984. p. 890 [Tecn. 44.004].
2. IBID — (A.O.A.C. p. 899 Tecn. 44.049)
3. IBID — (A.O.A.C. p. 900 Tecn. 44.052)
4. BRASIL - Leis, decretos, etc. — Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p.11613-4. Aprova as Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas)..
5. BRASIL — Leis, decretos, etc. — Portaria nº 1 de 4 de abril de 1986 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 8 de abril de 1986, Seção I, p.5039. Modifica características microscópicas de farinhas e seus derivados da Resolução nº 12/78 da CNNPA.
6. CHATT, E.M. — Adventitious metals in processed foods. *World Rev. Nutr. Diet.*, 4:141-56, 1964.
7. EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O. & DIAZ, N.M. — Método Chorleywood. In: *Fundamentos da Tecnologia de Panificação*. São Paulo, Coordenadoria da Indústria e Comércio, s.d., p. 157-68.
8. EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O. & DIAZ, N.M. — Princípios de sanificação da indústria de panificação. In: *Fundamentos da Tecnologia de Panificação*. São Paulo, Coordenadoria da Indústria e Comércio, s.d., p. 331-44.
9. SÃO PAULO — Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p.23 (NTA 47). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas...
10. SÃO PAULO — Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, Imprensa Oficial do Estado, 1985. p.11.
11. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.L., SPITERI, N. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Partículas metálicas em farinha de trigo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45:27-9, 1985.
12. ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. — Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49:11-7, 1989.
13. ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45:13-20, 1985.

Recebido para publicação em 28 de setembro de 1989.

DETERMINAÇÃO DE AMIDO EM SALSICHAS: COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE FEHLING E DE SOMOGYI-NELSON E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DO AMIDO*

Sabria AUED**
José Byron de CARVALHO**
Mário TAVARES**
Ana Maria ZANELATTO**
Liliana Brancacio BACETTI**

RIALA6/687

AUED, S.; CARVALHO, J.B.; TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M. & BACETTI, L.B.
— Determinação de amido em salsichas: comparação entre os métodos de Fehling e de Somogyi-Nelson e avaliação de metodologia para extração do amido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 251-256, 1990.

RESUMO: Visando comparar os métodos de Fehling (titulométrico) e de Somogyi-Nelson (espectrofotométrico) para determinação de amido em embutidos, foram analisadas cinco amostras de salsichas comerciais e sete especialmente elaboradas, contendo de 0 a 10% de fécula de mandioca (fonte de amido). Quando a formulação continha de 3 a 10% de fécula, os resultados foram similares pelos dois métodos, porém, entre 0 e 1%, não foi possível, pelo método de Fehling, a determinação de amido, enquanto em torno de 2% conseguiram-se resultados confiáveis apenas em parte das amostras analisadas. Por sua vez, o método espectrofotométrico revelou-se reproduzível, além de simples e rápido, para toda a faixa entre 0 e 10% de amido e, em particular, quando se trabalhou com baixas concentrações de amido (menor que 3%). Foi testada metodologia para extração de amido em salsichas, baseada em sua fase inicial (desengorduramento e eliminação de açúcares simples) no trabalho de GLOVER e col.⁷ Para avaliar a eficiência da extração do amido, foram realizados testes de recuperação utilizando cinco formulações de salsichas, com quantidades pré-estabelecidas de amido (entre 1 e 10%), a partir de uma formulação sem amido adicionado. Os resultados revelaram que, para a formulação com cerca de 9%, a eficiência média de recuperação foi de 85% e, para as demais formulações, superior a 90%, resultado bastante satisfatório.

DESCRITORES: Salsicha, determinação e extração de amido em; amido em salsicha, determinação e extração; métodos, estudo comparativo.

INTRODUÇÃO

A salsicha é um produto cárneo emulsionado, isto é, uma mistura homogênea de tecido muscular, sangue, vísceras, gordura e água, à qual são adicionados sais, condimentos e constituintes não-cárneos, como o amido^{8,10,18}.

O emprego do amido e seus derivados objetiva auxiliar a retenção de água e dar liga ao produ-

to^{8,10,13}. A sua adição em salsichas e em outros embutidos é permitida pela legislação brasileira, desde que sejam respeitados certos limites. No caso de salsichas, esse limite é de 2%⁴. Entretanto, visando à redução do custo de produção, alguns fabricantes adicionam quantidades superiores à permitida^{10,21}. Esta prática configura um crime contra a Saúde Pública².

Por sua vez, a gordura e a proteína, devido ao

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 12º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, 1989.
** Do Instituto Adolfo Lutz.

fato de estarem presentes em grande quantidade na salsicha, constituem-se em interferentes para a extração e dosagem do amido. Além destes ingredientes, outros, como a proteína de soja texturizada (PTS) e os condimentos, também causam interferências nas referidas operações, porque apresentam, respectivamente, quantidades consideráveis de açúcares simples⁵ e de amido em sua constituição²². Já os métodos analíticos oficiais para extração e dosagem, envolvem muitas operações e estão sujeitas a erros por parte do analista^{1,3}.

Em face do acima exposto, para dosar de maneira correta o amido adicionado são necessárias extrações eficientes dos interferentes (gordura, proteína e açúcares simples), bem como considerar a presença do amido proveniente dos condimentos. Em muitos laboratórios, a dosagem final dos açúcares redutores liberados, após hidrólise ácida do amido, é efetuada pelo método titulométrico de Fehling^{3,11} que, no entanto, apresenta dificuldades técnicas nos trabalhos rotineiros de análise de embutidos, especialmente salsichas. Isto ocorre devido aos baixos teores de amido e outros açúcares presentes naquela classe de alimento, e à presença de interferentes em grande proporção.

Devido às citadas interferências, têm sido estudados por diversos pesquisadores novos métodos, mais eficazes, para extração e dosagem do amido em salsichas, entre os quais o método enzimático, bastante específico para a determinação dos açúcares e, particularmente, do amido em embutidos^{6,7,9,12,14,15,16,20}.

No presente trabalho propõe-se comparar o método titulométrico de Fehling (oficial) com o de Somogyi-Nelson, espectrofotométrico^{17,19}, na dosagem de amido em amostras de salsichas, visto ser este apropriado para dosagem de baixas concentrações de açúcares redutores, baseado em leitura colorimétrica de um complexo estável, e empregar a maior parte dos reagentes utilizados no método de Fehling. Propõe-se, ainda, avaliar a metodologia para extração prévia do amido, baseando-se, em sua etapa inicial, no trabalho de GLOVER e col.⁷

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Para a etapa de comparação entre os dois métodos foram utilizadas cinco amostras de salsichas obtidas no comércio e sete, especialmente elaboradas para a pesquisa, contendo de 0 a 10% de fécula de mandioca (fornecendo cerca de 85% de amido).

Amostras dos principais ingredientes normalmente empregados na formulação de salsichas, contendo consideráveis teores de açúcares, tais como pimenta preta, pimenta branca, PTS e glicose, foram analisadas quanto ao percentual de açúcares redutores totais e amido. Tais ingredientes foram empregados na elaboração das formulações para os testes de recuperação.

Para a execução dos testes de recuperação, visando à avaliação de metodologia para extração do amido, partiu-se de uma formulação de salsicha, especialmente elaborada, que não continha amido adicionado, à qual foram acrescentadas quantidades conhecidas de amido solúvel "Merck". No total, foram preparadas cinco formulações, com 1, 2, 4, 5 e 10% de amido.

Métodos

Para a comparação entre os dois métodos, partiu-se de 10 g das amostras previamente homogeneizadas. As amostras foram desengorduradas, hidrolizadas e clarificadas, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹¹, enquanto a dosagem pelo método espectrofotométrico utilizou os reagentes de Somogyi e Nelson^{17,19} e seguiu o procedimento abaixo:

Método de Somogyi-Nelson

Equipamento: espectrofotômetro UV-visível, marca Bausch & Lomb, feixe simples.

Reagentes:

Reativo do Somogyi ou reativo cúprico — 25 ml do reativo A + 1 ml do reativo B.

Reativo A : Dissolva 25 g de carbonato de sódio, 25 g de sal de Rochelli (tartarato duplo de sódio e potássio), 20 g de bicarbonato de sódio e 200 g de sulfato de sódio anidro em 800 ml de água. Complete o volume para 1.000 ml, em balão volumétrico.

Reativo B : Prepare uma solução a 15% de sulfato de cobre penta-hidratado, contendo uma ou duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Reativo de Nelson : Dissolva 25 g de molibdato de amônio em 450 ml de água destilada. Adicione 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, agite e adicione 2 g de arseniato de sódio heptahidratado, dissolvido em 25 ml de água destilada. Deixe em banho termostatizado a 37°C, de 24 a 48 horas.

Curva-padrão : Pipete, para tubos de Folin-Wu, as seguintes alíquotas de uma solução-estoque de glicose 250 µg/ml: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 ml.

Adicione 1 ml do reativo cúprico, deixe em banho-maria fervente por 20 minutos. Esfrie e adicione 1 ml do reativo de Nelson. Complete o volume até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5 ml). Meça a transmitância a 500 nm, usando um "branco" para a calibração do espectrofotômetro.

Procedimento : Transfira 1 ml do hidrolisado, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹¹, após adequada diluição, para um tubo de Folin-Wu. Adicione os reativos de Somogyi-Nelson, procedendo conforme o descrito para elaboração da curva-padrão. Determine a concentração de glicose em µg/ml, a partir da curva-padrão.

Método de Extração e Dosagem de Amido

Extração de gordura e dos açúcares simples : o método desenvolvido nesta etapa baseou-se no trabalho de GLOVER e col.⁷, conforme o descrito abaixo.

Equipamento : centrífuga marca "Fanen", modelo 205 N/R.

Reagentes : Solução de etanol/éter de petróleo (1 + 3)

Etanol a 80%, a 80°C.

Procedimento : Pese 1 g da amostra homogeneizada em tubo de centrífuga de 15 ml. Adicione 10 ml de solução de etanol/éter de petróleo (1 + 3) e centrifugue a 2.500 r.p.m. por cinco minutos. Despreze o sobrenadante. Repita o procedimento anterior. Adicione 10 ml de etanol a 80%, a 80°C, ao resíduo e centrifugue a 2.500 r.p.m. por cinco minutos. Despreze o sobrenadante. Repita a extração alcoólica. Seque o resíduo em estufa a 70°C por 20 minutos.

Dosagem do amido : Transfira o resíduo obtido no tubo de centrífuga para um frasco Erlenmeyer de 500 ml, com boca esmerilhada. Adicione 100 ml de água destilada e 5 ml de ácido clorídrico concentrado. Hidrólise em refluxo por uma hora e meia. Neutralize, clarifique o hidrolisado e dose os açúcares redutores totais pelo método de Somogyi-Nelson, conforme descrito anteriormente. Calcule o teor de amido multiplicando o valor obtido em glicose por 0,9, que é o fator de conversão de glicose para amido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na determinação do amido nas amostras de salsichas, pelos métodos de Fehling e de Somogyi-Nelson, encontram-se na tabela 1.

TABELA 1

Porcentagem de amido em amostras de salsichas analisadas.*

AMOSTRAS	Métodos					
	Fehling			Somogyi-Nelson		
	\bar{x}	s	cv	\bar{x}	s	cv
A	0,00** ±	0,00	0	0,45 ±	0,01	2
B	0,00** ±	0,00	0	0,80 ±	0,02	2
C	0,00** ±	0,00	0	1,15 ±	0,01	1
D	1,51** ±	1,07	71	2,24 ±	0,05	2
E	1,60 ±	1,13	71	2,55 ±	0,04	2
F	3,14 ±	0,13	4	3,25 ±	0,15	5
G	3,35 ±	0,03	1	3,33 ±	0,05	1
H	4,30 ±	0,05	1	4,36 ±	0,05	1
I	5,72 ±	0,10	2	5,54 ±	0,06	1
J	6,42 ±	0,20	3	6,25 ±	0,05	1
K	9,26 ±	0,21	2	9,71 ±	0,18	2
L	9,01 ±	0,29	3	9,01 ±	0,42	5

Nota: As amostras E, G, H, J, K são comerciais.

* Média de três determinações dos valores obtidos para açúcares redutores totais, convertidos em amido, pelo fator 0,9.

** Não foi possível observar o ponto de viragem na titulação do reativo de Fehling ou foi gasto um volume superior a 100 ml.

TABELA 2

Teores de açúcares redutores totais e amido presentes em alguns ingredientes da formulação de salsichas.

Ingredientes	Açúcares redutores (%)*	Amido (%)**
Pimenta branca	69,10	62,19
Pimenta preta	61,47	55,32
Proteína texturizada de soja	22,67	—

* Determinados pelo método de Fehling (titulométrico).

** Valor obtido dos açúcares redutores totais, em glicose, multiplicado pelo fator 0,9.

TABELA 3

Porcentagem de recuperação do amido adicionado às salsichas. (Métodos: Extração, Glover modificado; dosagem, Somogyi-Nelson).

Amido adicionado %	Amido realmente adicionado* %	Amido obtido experimentalmente, (P)** %	P-B***	Recuperação de amido %		
				\bar{x}	s	cv
1,00	0,90	1,92	0,86	96	5	5
2,00	1,80	2,78	1,72	95	2	2
4,00	3,60	4,54	3,48	97	2	2
5,00	4,50	5,58	4,52	101	1	1
10,00	9,00	8,70	7,64	85	2	2

* O amido utilizado, marca Merck, continha 10% de umidade.

** Média de três determinações.

*** Teor de amido presente no "branco" (B = 1,06%)
B = "branco".

Comparando os resultados da tabela 1, verifica-se que os resultados obtidos pelos dois métodos são similares, quando as salsichas continham de 3 a 10% de amido.

Pelo método de Fehling, para as amostras contendo de 0 a 1% de amido, não foi possível a sua determinação, enquanto, em torno de 2%, conseguiram-se resultados confiáveis apenas em parte das amostras analisadas. Neste caso, os coeficientes de variação (cv) foram bastante elevados. A titulação do reativo de Fehling foi prejudicada pelo aparecimento de colorações anormais, isto é, arroxeadas e, em alguns casos, marrons, o que dificultou ou até mesmo impossibilitou a visualização do ponto de viragem.

Por outro lado, o método espectrofotométrico revelou-se preciso, além de prático, principal-

mente quando se trabalhou com baixas concentrações do amido. Foi possível determiná-los nas amostras contendo de zero a 2%, com resultados reprodutíveis, ou seja, com baixos coeficientes de variação (cv).

Teste de recuperação

Considerando que alguns ingredientes da formulação de salsichas, como condimentos, fornecem quantidades apreciáveis de açúcares, inclusive amido, conforme tabela 2, foi necessário fazer um "branco" antes de realizar os testes de recuperação. O teor de amido determinado na massa de salsicha com todos os ingredientes, exceto adição de fécula de mandioca, foi de 1,06% (valor médio de 05 determinações).

Os resultados do teste de recuperação (tabe-

la 3) revelaram que, à exceção da formulação com 9% de amido adicionado, a eficiência de recuperação foi superior a 90% e os coeficientes de variação foram baixos, isto é, altamente satisfatórios. Para a formulação com 9% de amido, o valor médio de recuperação foi de 85%, com baixo coeficiente de variação, resultado que pode ser considerado bom.

CONCLUSÕES

O método de Somogyi-Nelson apresenta as seguintes vantagens em relação ao método de Fehling: reprodutibilidade, sensibilidade, simplicidade e rapidez, tornando-o aplicável em análises de rotina para o controle de qualidade de produtos cárneos, especialmente aqueles contendo teores baixos de amido (de 1 a 3%).

O método de Fehling revelou-se confiável

apenas em amostras de salsichas contendo mais de 3% de amido.

A extração do amido, baseada no trabalho de GLOVER e col.⁷ mostrou-se adequada para sua avaliação em salsichas.

O método de extração de amido e o de Somogyi-Nelson, associados, estabelecem uma metodologia rápida e eficiente para a determinação de amido em embutidos, particularmente salsichas.

Agradecimentos

À FRIGOBRÁS — Companhia Brasileira de Frigoríficos e ao Frigorífico Marba Ltda., pela elaboração de amostras de salsicha para a realização do presente trabalho.

RIALA6/687

AUED, S.; CARVALHO, J.B.; TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M. & BACETTI, L.B. — Starch determination in sausages (*hot dogs*): comparison between the Fehling and Somogyi-Nelson methods and evaluation of methodology for starch extraction. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 251-256, 1990

ABSTRACT: In order to compare the Fehling (titrimetric) and Somogyi-Nelson (spectrophotometric) methods for determination of starch in sausages, five samples of commercially available sausages (*hot dogs*) were analyzed. Other seven especially prepared samples containing manioc fecula as starch source in concentrations varying between 0 and 10% were also examined. Sausages with a starch concentration of 3 to 10% yielded similar results with both methods. With the Fehling's method it was not possible to detect starch at concentrations below 1% while at concentrations of about 2% the results were doubtful. On the other hand, the spectrophotometric method revealed itself accurate and of simple performance, being especially useful for determination of low concentrations of starch (less than 3%). Starch extraction from sausages based on the method of Glover and collaborators was evaluated by recovery tests carried out with five sausages with known starch content. The results showed that in samples containing about 9% of starch the mean recovery efficiency was 85% while in other ones it was up to 90%.

DESCRIPTORS: sausages (*hot dogs*), determination and extraction of starch; starch in sausages, determination and extraction; starch in sausages, methods of determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Arlington, Va. A.O.A.C., 1984. p. 442.
2. BRASIL — Leis, decretos, etc. — Decreto-lei nº 2848 de 07.12.40: Código Penal. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, 31 de dez. 1940. Seção I, 23911 - 34.
3. BRASIL — Leis, decretos, etc. — Portaria nº 01/84, do Laboratório Nacional de Referência Animal. *Diário Oficial*, Brasília, 11 jan. 1984. Seç. I, p. 527. Aprova método analítico para determinação quantitativa de amido em produtos cárneos.
4. BRASIL — Leis, decretos, etc. — Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29.03.52, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25.06.62). Brasília, Ministério da Agricultura, 1980. p 113-14.
5. ELDRIDGE, A.C.; BLACK, L.T. & WOLF, W.J. — Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates, and isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 799-805, 1979.
6. GARCIA, E.; CORDENUNSI, B.R. & LAJOLO, F.M. — Determinação de amido em embutidos: comparação entre o método de Fehling e método enzimático. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 5: 39-46, 1985.
7. GLOVER, W.; MERCHENBAUM, H. & CALDWELL, A. — Test for the determination of starch in meat food products. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*; 49: 307-9, 1966.
8. GOMIDE, L.A.M.; PEREIRA, A.S. & GOMES, J.C. — Avaliação físico-química de salsichas Viena enlatadas. *Alimentação*, 76: 22-9, 1985.
9. HART, F.L. & FISHER, H.J. - *Modern Food Analysis*. New York, Springer, 1975. p. 194, 365-79.
10. HSU, L.A.; CIAMPI, C.M.S.; DELAZARI, I; LAZARINE, V.B.; GALVÃO, L.C.A. & FIGUEIREDO, I.B. — Avaliação da qualidade de salsichas. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*; 53:93-107, 1977.
11. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. v.1, p. 46-54.
12. LAJOLO, F.M. & AREAS, J.A.G. — Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climáticas e climáticas. *An. Farm. Quim. S. Paulo*, 20: 307-18, 1980.
13. LAUCK, R.M. — The functionality of binders in meat emulsions. *J. Food Sci.*, 40: 736-40, 1975.
14. LEE, C.K. — The determinations of carbohydrates in foods. In: KING, R.D. — *Developments in foods analysis techniques*. London, Applied Sci., 1978. v. 1, p. 261-91.
15. MORAES, O.M.G. & CHAVES, M.B. — Método espectrofotométrico para determinação de amido em produtos cárneos. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4º, Belo Horizonte, 1988.
16. MORRIS, D.L. — Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*. 107:254-5, 1948.
17. NELSON, N. — A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.*, 153: 375-80, 1944.
18. RODRIGUES, F.A. — *Tecnologia dos produtos cárneos*. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos — ITAL, Centro de Tecnologia de Carne, 1978. p. 99-103.
19. SOMOGYI, M. — Determination of blood sugar. *J. biol. Chem.*, 160: 69, 1945.
20. STEVENS, F.J. & CHAPMAN, R.A. — The determination of starch in meat products with the anthrone reagent. *Ass. off. Agric. Chem.*, - 38: 202-10, 1955.
21. TAKINO, M.; KOMATSU, I. & GALLI, F. — A porcentagem de amido na salsicha e mortadela fabricada em São Paulo. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 29 (supl.): 124-5, 1977. [Resumo 54-A.5.1.]
22. WINTON, A.L. & WINTON, K.B. — *The structure and composition of foods*. New York, Wiley, 1939. v. 4, p. 319-40.

Recebido para publicação em 27 de novembro de 1989.

BETA-CAROTENO, URUCUM E CÚRCUMA EM MASSAS ALIMENTÍCIAS VITAMINADAS COM OVOS*

Mickiko Yamasaki TAKAHASHI**
Emiko Ikejiri INOMATA**
Helena Yuco YABIKU**
Cláudia M. P. GIANNATTASIO**

RIALA 6/688

TAKAHASHI, M. Y.; INOMATA, E. I.; YABIKU, H. Y. & GIANNATTASIO, C. M. P. -
Beta-caroteno, urucum e cúrcuma em massas alimentícias vitaminadas com ovos.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 50(1/2): 257-260, 1990.

RESUMO: Foram analisadas 53 amostras de massas alimentícias vitaminadas com ovos, para a pesquisa de urucum e cúrcuma, corantes não permitidos pela legislação brasileira, na presença de beta-caroteno (pró-vitamina A). Em 22 (41,51%) amostras foi detectada a presença de corantes e 22 (41,51%) amostras apresentaram teor de beta-caroteno abaixo de 200 UI/100g, limite mínimo permitido pela legislação. A presença de urucum e/ou cúrcuma foi verificada em 77,27% das amostras com teor de beta-caroteno condematório, o que mostra um alto índice de fraude nesses produtos.

DESCRIPTORIOS: massas alimentícias com ovos, beta-caroteno, urucum e cúrcuma em; beta-caroteno; urucum; cúrcuma.

INTRODUÇÃO

O emprego de corantes em alimentos processados tem-se constituído hábito industrial, na tentativa de restabelecer ou desenvolver uma coloração mais agradável ao consumidor.

Além da farinha de trigo e semolina, outros ingredientes são empregados na industrialização de massas alimentícias, desde que permitidos pela legislação vigente e declarados na rotulagem do produto final. O uso dos corantes naturais urucum e cúrcuma, nas massas alimentícias sem ovos está regulamentado pela tabela 1 do Decreto nº 55.871, de 26/3/65¹.

O extrato de urucum (*Bixa orellana* L.), conhecido também como annatto, contém vários corantes sendo a bixina (extrato lipossolúvel) ou a norbixina (extrato hidrossolúvel) o principal; a tonalidade desses corantes varia do vermelho ao castanho-avermelhado⁷.

A cúrcuma, corante extraído dos rizomas da *Curcuma longa* L., contém como princípio ativo a curcumina, de tonalidade amarelo-alaranjado.

O regulamento sanitário da Secretaria da Saúde do Estado, aprovado pelo Decreto nº 12.486 de 20/10/78 (NTA 49), definiu que massa com ovos deve conter no mínimo três ovos por quilo em sua composição e não deve ser adicionado de qualquer corante. Entretanto, é permitido o seu enriquecimento com vitaminas, sais minerais e outras substâncias de valor biológico específico. A NTA 82, do mesmo decreto, permite a adição de pró-vitamina A em produtos alimentícios, na quantidade mínima equivalente a 200 UI de vitamina A/100g, quando a aparência normal de um produto não puder sofrer pronunciada alteração de cor⁶. Nas massas alimentícias com ovos, é utilizado o beta-caroteno, um carotenóide com atividade vitamínica.

Os carotenóides, pigmentos derivados do iso-

* Realizado na Seção de Química Biológica e na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

** Do Instituto Adolfo Lutz.

preno, proporcionam uma gama de tonalidade de cor do amarelo ao vermelho; são importantes do ponto de vista da nutrição humana e animal porque alguns deles se convertem em vitamina A na mucosa intestinal dos animais³.

Os mais conhecidos precursores da vitamina A que se encontram na natureza são: alfa, beta, gama, neo-beta-caroteno e criptoxantina. O mais ativo é o beta-caroteno porque tem dois anéis beta-ionônicos e é capaz de dividir-se em duas moléculas de vitamina A, ao passo que os demais têm apenas um anel beta-ionônico^{2,3}. A FAO/OMS convencionou que um micrograma de beta-caroteno equivale a 0,56 UI de vitamina A ou 0,167 microgramas de retinol¹³.

A suspeita de fraude nas massas alimentícias vitaminadas com ovos pela adição dos corantes naturais urucum e cúrcuma, não permitidos pela legislação vigente neste tipo de produto, nos levou à pesquisa desses aditivos, na presença de beta-caroteno (pró-vitamina A).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 53 amostras de massas alimentícias vitaminadas com ovos, de 33 marcas diferentes, sendo: 25 amostras de massa longa, 18 de massa curta e dez amostras de massinha, adquiridas em supermercados e procedentes dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Ceará e Espírito Santo, para a determinação de beta-caroteno e pesquisa de urucum e cúrcuma.

Métodos

Reagentes

a) Determinação de β -caroteno

Álcool (isento de aldeídos e peróxidos)

Glicerina p. a.

Éter de petróleo p. a. (30- 60°C)

Sulfato de sódio anidro

Indicador fenoltaleína a 1% (solução alcoólica)

b) Pesquisa de urucum

Solução padrão de bixina em clorofórmio

Ácido clorídrico a 10% v/v

Benzeno p.a

Cromatofolhas de sílica gel 60

Solvente para cromatografia: clorofórmio/ácido acético (9:1)

c) Pesquisa de cúrcuma

Ácido acético glacial p.a.

Ácido oxálico/ácido bórico (1:1)

Aparelho

Espectrofotômetro de absorção na região do visível e ultravioleta*.

Procedimento

a) Determinação de beta-caroteno

Pese 5,0g da amostra moída, saponifique e extraia segundo a técnica descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁴ para análise de vitamina A. Transfira o extrato para um balão volumétrico de 50,0 ml e complete o volume com éter de petróleo. Determine a absorção em espectrofotômetro a 450 nm, usando éter de petróleo como branco e calcule a concentração de acordo com a fórmula descrita para beta-caroteno⁴.

b) Pesquisa de urucum

Transfira o resíduo da extração do beta-caroteno descrito em a) para um funil de separação de 250 ml e acidifique com ácido clorídrico a 10%. Extraia com pequenas porções de benzeno (3x10 ml). Reúna os extratos benzênicos e concentre sob nitrogênio (em capela). Cromatografe dez microlitros do extrato benzênico e dois microlitros da solução padrão de bixina, utilizando clorofórmio/ácido acético como fase móvel. Desenvolva o cromatograma até a altura de aproximadamente 12 cm e compare as manchas da amostra e do padrão.

A confirmação da presença do urucum deverá ser feita de acordo com o método das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.⁴

c) Pesquisa de cúrcuma

Pese aproximadamente 10g da amostra em um béquer de 150 ml. Adicione 20 ml de ácido acético. Agite com um bastão de vidro. Filtre para um tubo de ensaio e coloque em banho fervente, por alguns minutos. Adicione 1,0 g da mistura ácido oxálico/ácido bórico. Espere mais alguns minutos. Uma coloração vermelha indica a presença de cúrcuma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

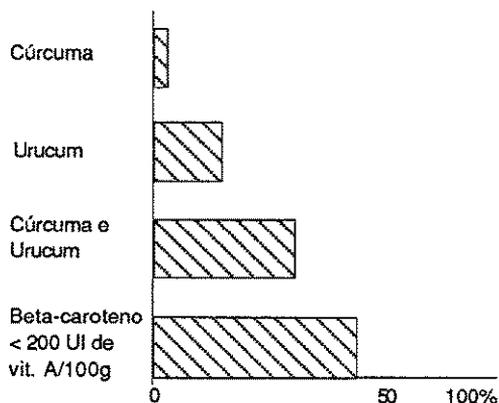
A tabela mostra que 22 (41,51%) amostras analisadas apresentaram corantes naturais (urucum e/ou cúrcuma), não permitidos pela legislação vi-

* Varian, modelo 635.

TABELA

Teor de beta-caroteno e presença de urucum e cúrcuma em massas alimentícias vitaminadas com ovos

Amostra	Marca	β-caroteno em vitamina A, UI/100g	Presença de urucum	Presença de cúrcuma
1	A	384,9	-	-
2	A	288,6	-	-
3	A	327,8	-	-
4	B	1333,8	-	-
5	C	316,1	-	-
6	D	707,8	+	-
7	E	127,1	+	-
8	F	185,5	-	+
9	F	174,6	-	-
10	G	82,3	+	+
11	G	65,3	+	+
12	H	371,1	-	-
13	I	132,0	+	+
14	J	584,0	-	-
15	K	494,7	-	-
16	L	611,6	-	-
17	L	652,8	-	-
18	M	151,2	+	+
19	M	68,7	+	+
20	N	36,4	-	-
21	N	66,0	-	-
22	O	1154,5	-	-
23	P	323,0	-	-
24	P	573,3	-	-
25	P	432,9	-	-
26	Q	119,6	+	-
27	R	56,0	+	+
28	R	364,2	+	+
29	R	49,5	+	+
30	S	1030,7	+	-
31	S	419,2	+	-
32	T	299,0	-	-
33	U	288,6	-	-
34	V	577,2	-	-
35	V	426,0	-	-
36	V	419,2	-	-
37	X	481,0	-	-
38	Z	178,5	-	-
39	A ₁	467,3	-	-
40	B ₁	56,3	+	+
41	B ₁	41,2	+	+
42	B ₁	59,8	+	+
43	C ₁	371,1	-	-
44	C ₁	135,4	+	+
45	C ₁	371,1	+	-
46	D ₁	89,3	+	+
47	D ₁	236,4	-	-
48	E ₁	59,1	+	+
49	F ₁	46,7	-	-
50	G ₁	701,0	-	-
51	G ₁	549,8	-	-
52	H ₁	85,2	+	-
53	I ₁	274,9	-	-



Porcentagem de amostras analisadas em desacordo com a legislação vigente:

amostra com cúrcuma: 1,88% (1 amostra)
 amostras com urucum: 13,20% (7 amostras)
 amostras com urucum + cúrcuma: 26,41% (14 amostras)
 amostras com beta-caroteno abaixo de 200 UI/100g: 41,51% (22 amostras)

gente em massas alimentícias com ovos e vitaminadas.

De acordo com a tabela e a figura, verificamos que 41,51% das amostras analisadas apresentaram teor de beta-caroteno abaixo de 200 UI/100 g, limite mínimo permitido pela legislação em massas alimentícias vitaminadas com ovos. Destas amostras, 77,27% continham corantes naturais não permitidos, o que vem confirmar nossas suspeitas quanto à utilização de urucum e cúrcuma em massas alimentícias com ovos, substituindo o beta-caroteno, que além de corante, possui atividade vitamínica. A utilização do beta-caroteno, nesse caso, tem ação preponderante de corante e não de precursora de vitamina A, segundo SABINO e col¹⁵.

CONCLUSÃO

A pesquisa mostrou um percentual muito elevado de amostras com corantes naturais não permitidos pela legislação brasileira em massas alimentícias vitaminadas com ovos, o que vem demonstrar a necessidade de um controle mais rigoroso por parte da fiscalização.

RIALA 6/688

TAKAHASHI, M.Y.; INOMATA, E.I.; YABIKU, H.Y. & GIANNATTASIO, C.M.P. - Beta-carotene, annatto and turmeric in egg-added flour foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 257-260, 1990.

ABSTRACT: Fifty-three samples of vitaminic egg-added flour foods were analysed in order to investigate the presence of annatto and turmeric. These natural dyes are not allowed in vitaminic egg-added flour foods with beta-carotene by Brazilian law. Of a total 53 samples tested, 41,51% presented annatto and turmeric and beta-carotene levels below 200 IU/100g, the minimum level permitted by Brazilian legislation. These samples with low levels of beta-carotene, 77,27% presented annatto and/or turmeric; this facts show a high fraud index in this type of products.

DESCRIPTORS: flour-foods, beta-carotene, annatto, turmeric.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965. *Diário Oficial*, Brasília, 9 de abril de 1965: Seq. I, pt. I, p. 3610. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962.
2. EMODI, A. - Carotenoids. Properties and applications. *Food Technol.*, 32:38-42, 1978.
3. ISLER, O., - Carotenoids. Basel, Birkhäuser, 1971. p. 717-746.
4. Instituto Adolfo Lutz. SÃO PAULO *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985. v.1. p. 110, 379, 383.*
5. SABINO, M.; INOMATA, E. I. & PREGNOLATTO, W. - Estabilidade do β -caroteno em massas alimentícias vitaminadas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 55-59, 1979.
6. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de outubro de 1978. p. 38 (NTA 82). Aprova normas técnicas relativas a alimentos e bebidas.
7. YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y.; CARUSO, M. S. F. & MENEZES, C. A. S. - Subsídios para o estabelecimento de metodologia para o controle de corantes naturais para alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46: 11 - 18, 1986.

Recebido para publicação em 16 de janeiro de 1990.

CYTOLOGICAL, CYTOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL
FINDINGS FROM TWO CHILDREN WITH CHEDIAK-HIGASHI
SYNDROME*

Adele CATERINO-de-ARAÚJO**
Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA**
Magda Maria de Sales CARNEIRO-SAMPAIO***

RIALA6/689

CATERINO-de-ARAÚJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E. de los & CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. — Cytological, cytochemical and immunological findings from two children with Chediak-Higashi syndrome. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 261-267, 1990.

ABSTRACT: This article describes studies of two unrelated patients, aged near 2 years, with leukocyte granulation abnormalities similar to those presented in the Chediak-Higashi Syndrome (CHS). Both patients showed dermatologic manifestations characterized by hypopigmentation of the hair and skin. The cytological and cytochemical study of the peripheral blood leukocytes demonstrated giant abnormal granules with lisosomal content presented in neutrophils, eosinophils and monocytes. The mononuclear cells displayed one large azurophil granule. The cytochemical functional study of neutrophils showed normal nitroblue-tetrazolium reduction test. The immunological status of the patients were made and in patient 1 was detected a low number of T helper lymphocytes and a maintenance of lymphocytes in continuous cell culture for five weeks without addition of external growth factor. These findings with clinical manifestations permitted to establish the CHS, in these cases.

DESCRIPTORS: Chediak-Higashi Syndrome (CHS); peripheral blood leukocytes; abnormal granules; cytological, cytochemical and immunological study; lymphocyte subsets.

INTRODUCTION

Chediak-Higashi Syndrome (CHS) is an inherited autosomal recessive generalized cellular disorder characterized by partial albinism (depigmentation of eye, hair and skin), frequent pyogenic infections and abnormal large granules in leukocytes and other granule-containing cells. CHS patients frequently exhibit neutropenia, relative lymphocytosis, thrombocytopenia, nystagmus, peripheral neuropathy, fever of unknown origin and impairment of natural killer cells function. The disease evolves to an accelerated phase with pancytopenia and a diffuse mononuclear infiltrate³. This rapidly proliferative phase

usually leads to death from infection or hemorrhage, and may be associated with a T-cell lymphoma².

The identification of abnormally large cytoplasmic inclusions in circulating white blood cells and bone marrow is a very important morphologic marker for CHS^{4,11}. These inclusions are shown as multiple irregular grey to dark blue granules in neutrophils and one large azurophil granule in lymphocytes and monocytes, when stained with Wright's stain. In neutrophils, cytochemical studies have shown that these granules were positive for peroxidase, acid phosphatase and esterase.

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

*** Do Departamento de Imunologia Clínica, Instituto da Criança "Prof. Pedro de Alcântara", Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, SP.

In this report, we describe two unrelated patients with clinical, morphologic and cytochemical features of leukocytes similar to those from patients with CHS. One of them showed also lymphocytosis.

CASES AND METHODS

Patient 1

Patient 1 is a 2.1-yr-old mulatto male who was a 7 pound, 8-ounce, 40-week-gestation product of a 31-yr-old woman. Neonatal cyanosis during the period of 24 hours and nasal obstruction were noted. At age of 2 months the patient presented bronchopneumonia and at 5 months he was found to have hypopigmented skin and hair.

The family medical history reported a brother and a cousin who died after presenting the same cutaneous picture. He has two normal brothers and two normal sisters. The parents are cousins.

The patient has no history of other serious infections. However, he did experience repeated bouts of furunculosis.

The child was referred to the Instituto da Criança "Prof. Pedro de Alcântara", Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and the Chediak-Higashi syndrome was diagnosed by the examination of the blood and bone marrow samples that revealed large, abnormal granules in most granulocytes and in many lymphocytes and monocytes.

At that time, the patient was found to have enlarged spleen and liver, moderate anaemia and otitis media. He was treated with ferrous sulphate, antibiotics and ascorbic acid (1g/day). After then, he showed a transient period of lymphocytosis.

Patient 2

Patient 2 is a 2-yr-old mulatto girl who has no family history since her parents were anophthalmic. She is adoptive daughter of a rich family.

The patient was referred to the "Instituto da Criança Prof. Pedro de Alcântara, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo" due to dermatologic problems. On admission the child presented partial albinism with depigmentation of eye, hair and skin, photophobia, nystagmus, intermittent febrile episodes and pyogenic infections. The presence of abnormal large granules in the cytoplasm of peripheral leukocytes and bone marrow finally led to the diagnosis of CHS.

Nowadays, she is in a good health, with no signs of the accelerated phase of the disease.

Laboratorial Methods

Peripheral blood and bone marrow smears were processed by Leishman stain. The peripheral blood leukocytes were stained for acid phosphatase, alkaline phosphatase, peroxidase, mucopolysaccharides (PAS), neutral fat (Sudan Black), nonspecific esterase using alpha-naphthyl butyrate as substrate¹⁹. The nitroblue-tetrazolium (NBT) reduction test, stimulated or not with lipopolysaccharide, was also performed¹⁰. All reagents used were from SIGMA Co., U. S. A.

Mononuclear cells from peripheral blood were isolated by centrifugation on a ficoll-hypaque gradient. The number of T and B was determined by the rosette method using sheep red blood cells and zymosan-complement complex¹.

Determinations of the subset lymphocytes bearing the CD4 or CD8 marker were made by staining cells with a fluorescein conjugated monoclonal antibody (Leu 3a and Leu 2a, Becton-Dickinson, U. S. A.), using a direct immunofluorescence assay¹.

The lymphocytes of the patient 1 were stimulated with phytohemagglutinin mitogen and also maintained in suspension culture for five weeks, without addition of external growth factors⁵. The medium was changed weekly by a fresh one through centrifugation of the cells in culture. The viability was determined by trypan blue exclusion technique.

RESULTS

Cytological study

The bone marrow smears showed abnormal granules in megakaryocytes, promyelocytes, myelocytes and leukocytes in both cases.

Light microscopic and cytochemical studies from peripheral blood leukocytes showed the characteristic lysosomal granules, as previously described in CHS.

The neutrophil and eosinophil cells stained by Leishman and Rosenfeld stains displayed variable number, size, shape and color of the granules in both patients (Figure 1A, B).

Patient 1 presented 90% of neutrophils with abnormal granules, ranging from 5 to 10 per cell and with variable electron dense content. Approximately 30% of the lymphocytes had one

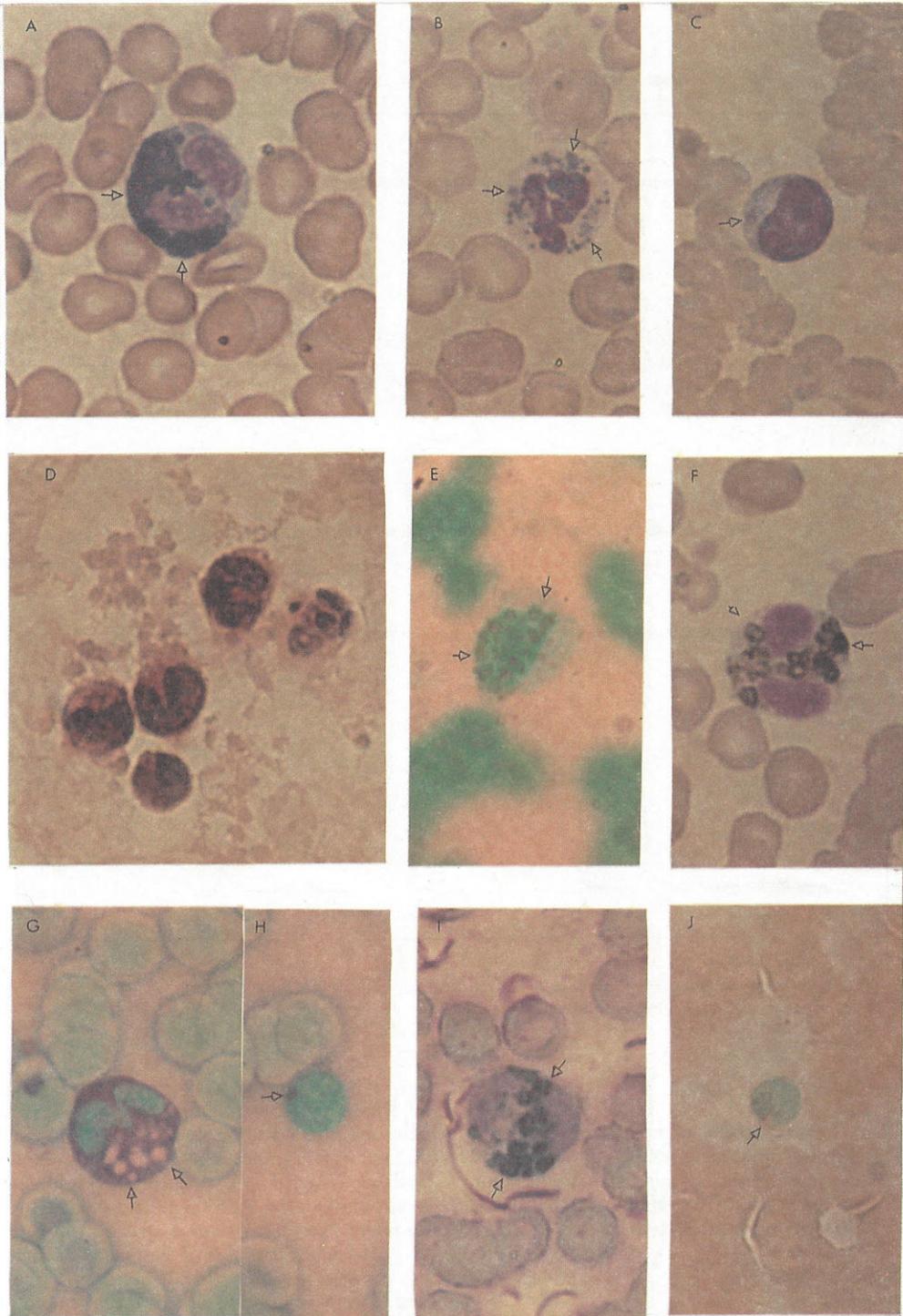


FIGURE 1 — Morphology and cytochemistry of Chediak-Higashi's abnormal granules indicated by arrows: A- eosinophilic granulocyte, B- neutrophilic granulocyte, C- lymphocyte (Leishman stain x 1000), D- positive acid phosphatase in leukocytes, E- positive alkaline phosphatase in neutrophilic granulocyte, F- positive peroxidase reaction in neutrophilic granulocyte, G- negative PAS in neutrophilic granulocyte, H- positive PAS in lymphocyte, I- positive Sudan-black reaction in neutrophilic granulocyte, J- positive nonspecific esterase in lymphocyte.

TABLE 1

FCytochemical characteristics of leukocytes granules from the two patients.

	acid phosphatase	alkalin phosphatase	peroxidase	P.A.S	Sudan Black	nonspecific esterase
neutrophil	pos/neg	pos	pos	neg	pos	pos
eosinophil	pos/neg	pos	pos	neg	pos	pos
monocyte	pos/neg	neg	pos	pos	pos	pos
lymphocyte	pos/neg	neg	neg	pos	neg	pos

pos = positive.
neg = negative.

TABLE 2

White blood cell count and lymphocytes subsets from the two patients.

	Patient 1		Patient 2	
leukocytes x 10 ⁶ /l	6.700	50,700	8,400	10,800
neutrophils %	32,0	5.0	29.0	36.0
eosinophils %	0.0	3.0	0.0	2.0
monocytes %	10.0	4.0	3.0	2.0
lymphocytes %	58.0	88.0	68.0	60.0
lymphocytes x 10 ⁶ /l	3,886	50,116	5,712	6,480
T lymphocytes x 10 ⁶ /l	N.D.*	25,545	N.D.	2,981
T lymphocytes %	N.D.	45.0	N.D.	46.0
B lymphocytes x 10 ⁶ /l	N.D.	4,008	N.D.	842
B lymphocytes %	N.D.	8.0	N.D.	13.0
T helper cells % **	N.D.	22.0	N.D.	N.D.
T suppressor cells % ***	N.D.	17.0	N.D.	N.D.
T helper / T suppressor	N.D.	1.2	N.D.	N.D.

* N.D. = not done.

** T helper cells = CD4+ lymphocytes.

*** T suppressor cells = CD8+ lymphocytes.

purple stained body (Figure 1C).

Patient 2 showed 81% of neutrophils with 16 to 25 abnormal granules and 100% of eosinophils with a median of 40 inclusion bodies per cell. Forty percent of lymphocytes contained one large granule were around 40.

Cytochemical Study

The results of the cytochemical reactivity of the granules in the leukocytes are summarized in Table 1.

The reactivity of the neutrophil, eosinophil, lymphocyte and monocyte granules for acid phosphatase was positive (Figure 1D) and nega-

tive. Alkalin phosphatase reaction was negative in lymphocytes and monocytes and positive in neutrophils (Figure 1E). Except in lymphocytes, all abnormal granules are strongly peroxidase-positive (Figure 1F). Abnormal granulations in neutrophils were PAS negative, while the surrounding cytoplasm stained strongly pink (Figure 1G). The giant granules of lymphocytes and monocytes gave positive PAS reaction (Figure 1H). There were some variation in the intensity of the reactivity of the granules with Sudan-Black being strongly positive in neutrophils, eosinophils and monocytes (Figure 1I), and negative in the lymphocytes. Esterase activity of the granule was shown as a large, reddish brown aggregate (Figure 1J) resulting from a strong enzymatic activity

and also as a weak diffuse staining in the cytoplasm of neutrophils and monocytes.

The NBT histochemical stimulated test, using lipopolysaccharide from *E.coli* was positive in 58% of neutrophils from patient 1 and 88% in neutrophils from patient 2.

Immunological evaluation

The results of the quantitative analysis of the blood cells are shown in Table 2.

The CHS patients showed a low neutrophils count.

The patient 1 exhibit leukocytosis and lymphocytosis during a period of the disease, when his T and B lymphocytes were diminished in percentage and increased in total number. The patient 2 displayed similar results of T and B lymphocytes in percentage but in absolute number there were normal. The lymphocytes subsets were found altered with a low number of T helper cells in patient 1 when compared with a control group.

The patient 1 was studied three times. In the second one he showed an episode of lymphoproliferation, returning to normal after two months.

Normal values obtained from twenty healthy children aged from four months to fourteen years old without clinical and immunological disorder were: lymphocytes 3,165 x 10⁶/l, T lymphocytes 60%, B lymphocytes 15%, T helper cells 39.5%, T suppressor cells 25%, T helper/T suppressor ratio= 1.7.

The mononuclear cells obtained from patient 1 during the lymphoproliferative phase showed normal response to the PHA and remained alive in continuous culture for five weeks, with a viability ranging from 96 to 60%. The cells death in the culture was due to fungal contamination.

DISCUSSION

In this study two cases of CHS are presented. Both are mulatto children from the North East region of Brazil where the consanguineous marriages are frequent, as referred in familial history of patient 1.

The clinical manifestations frequently reported in CHS were noted in these patients. They showed skin hypopigmentation and silvery tint color of the hair^{3,9}. Patient 2 mentioned a susceptibility to sunlight and had also photophobia and rotatory nystagmus. Both patients referred repeated febrile

episodes with recurrent infectious diseases.

An interview with the mother of patient 1 revealed the death of another son and nephew with the same cutaneous picture.

The cutaneous hypopigmentation seen in these patients are specially related to giant melanosomes present in melanocytes³.

The genetic involvement in this disorder is determined by one recessive gene that is lethal in homozygous state¹⁷. The karyotype has been found normal in number of chromosome but with prevalent breakages in chromatide¹⁵. The consanguineous marriages are frequent in these cases⁶.

In both cases of this paper, the CHS was diagnosed by laboratorial pathognomonic finding of abnormal granules present in peripheral blood and bone marrow leukocytes, similar to those previously described in morphological and cytochemical tests^{4,11,15}.

Variations in number, size, shape and color of the granules were displayed in polymorphonuclear leukocytes. The lysosomal nature of the granules was demonstrated by their acid phosphatase, peroxidase and esterase content. The amount of reaction product deposited in the abnormal granules and its distribution were extremely variable, even in the same cell, and this is probably associated with the presence of primary and secondary lysosomes. An explanation for the discrepancy in cell levels of lysosomal enzymes in CHS was previously demonstrated and revealed that most of the giant granules were lysosomes, loaded with substances derived from specific granules and cytoplasmic materials¹⁸.

Although in this study the majority of leukocytes showed large abnormal granules, the respiratory burst activity was normal, as demonstrated by a normal stimulated NBT test. Similar results were described in two patients with leukocytes granulation abnormalities associated with neurologic impairment, without other signs of CHS⁸.

Abnormalities of cyclic nucleotide metabolism, disorders of microtubule assembly, impaired neutrophil and monocyte chemotaxis, and delayed phagolysosomal fusion are related to the increased susceptibility of these patients to infection and justify the classification of this entity as a "phagocyte disorder"^{13,14,18}.

In order to correct the microtubule defect and membrane fluidity in both patients, megadoses of ascorbic acid was used^{3,9}. A transient reduction in the number of abnormal granules in leukocytes was observed in patient 1. On the other hand, after six months follow-up he developed a

marked leukocytosis and lymphocytosis. Despite of the increased number of lymphocytes, CD4+ lymphocytes were diminished in percentage. In addition to this, the mononuclear cells obtained from patient 1 at this time were capable of remaining alive for five weeks in continuous cell culture, without additional conditioned medium.

Several reports suggest that lymphoproliferative phase of the disease is a reaction to a viral infection attributed to Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus or to Varicella-zoster virus^{3,5,7,12,16}; however, direct evidence for this generally lacking. The basis for the marked cellular proliferation is not understood. In the present study it was not possible to demonstrate virus-like particle in peripheral blood cells nor to perform serological tests.

Others observations do not exclude the possibility of a reactive process which coexist with a neoplastic one. So, lymphomas Hodgkin's and the T-cell type were described². Some patients experience repeated lymphoproliferative phases interrupted by periods of remission. Our patient 1 presented fever, jaundice, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy and pancytopenia and at a peripheral level he presented a mixed population of lymphoid cells and not a homogeneous population of highly atypical cells. This is consis-

tent with a benign reactive process.

Continuous cell lines from peripheral blood lymphocytes were established from one male patient with CHS (homozygous line) and from his father (heterozygous line), although no fungal, bacterial and viral material could be recovered⁵. It's not known, whether viral agents are present "in vivo" in the cells obtained for culture or released from a latent stage upon being subjected to "in vitro" conditions.

Little is known about patient 2 since her parents are anonymous. Nevertheless, both patients have been followed, and a bone marrow transplant is being evaluated as an approach to correct a series of abnormalities that involves hematopoietic progenitor cells.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Primavera B. Garcia from Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo for cytochemical staining and Dr. Bernardo Ezemberg from Instituto da Criança "Prof. Pedro de Alcântara" do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo for sending us the patient 2.

RIAL6/689

CATERINO-de-ARAÚJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E. de los & CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. de S. — Estudo citológico, citotímico e imunológico de duas crianças com síndrome de Chediak-Higashi. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 261-267, 1990.

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo relatar os resultados obtidos do estudo clínico e laboratorial de duas crianças não aparentadas com idade aproximada de dois anos que apresentavam leucócitos com granulações anormais no sangue periférico semelhantes às observadas na Síndrome de Chediak-Higashi (SCH). Em ambos os casos havia manifestação dermatológica caracterizada por hipopigmentação da pele e cabelos. O estudo citológico e citotímico das células do sangue dessas crianças mostrou grande número de grânulos gigantes que continham enzimas lisossomais em neutrófilos e eosinófilos. As células mononucleares apresentaram um único grânulo gigante azurófilo. O estudo citotímico funcional dos neutrófilos mostrou capacidade normal de redução do corante "nitrobluc-tetrazolium" (NBT). O estudo fenotípico das populações linfocitárias nesses casos revelou diminuição no número de linfócitos T auxiliares no paciente 1, durante uma fase de linfoproliferação. Esses linfócitos permaneceram viáveis por cinco semanas em cultura sem adição externa de fatores de crescimento celular. Os resultados obtidos permitiram o diagnóstico de SCH nessas crianças.

DESCRITORES: Síndrome de Chediak-Higashi (SCH); leucócitos do sangue periférico; granulações anormais; estudo citológico, citotímico e imunológico; subpopulações de linfócitos.

REFERENCES

1. ARAUJO, A. C. — Avaliação "in vitro" da resposta imune mediada por células na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida—AIDS. São Paulo, 1985. [Masters Thesis. Escola Paulista de Medicina, São Paulo] p.136.
2. ARGYLE, J. B.; KJELDSBERG, C. R.; MARTY, J.; SHIGEOKA, A. O. & HILL, H. R. — T-Cell lymphoma and the Chediak-Higashi syndrome. *Blood*, 60:672-676, 1982.
3. BARAK, Y. & NIR, E. — Chediak-Higashi syndrome. *Amer. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 9: 42-55, 1987.
4. BESSIS, M.; BERNARD, J. & SELIGMANN, M. — Étude cytologique d'un cas de maladie de Chediak. *Nouv. Rev. fr. Hem.*, 1: 422-440, 1961.
5. BLUME, R.S.; GLADE, P.R.; GRALNICK, H.R.; CHESSIN, L.N.; HAASE, A.T. & WOLFF, S.M. — Chediak-Higashi syndrome: continuous suspension cultures derived from peripheral blood. *Blood*, 33: 821-832, 1969.
6. BLUME, R.S. & WOLFF, S.M. — The Chediak-Higashi syndrome: studies in four patients and a review of the literature. *Medicine*, 51: 247-280, 1972.
7. DOUGLAS, S.D.; BLUME, R.S.; GLADE, P.R.; CHESSIN, L.N. & WOLFF, S.M. — Fine structure of continuous long term lymphoid cell cultures from a Chediak-Higashi patient and heterozygote. *Lab. Invest.*, 21: 225-229, 1969.
8. GALE, P.F.; PARKIN, J.L.; QUIE, P.G.; PETTIT, R.E.; NELSON, R.P. & BRUNNING, R.D. — Leukocyte granulation abnormality associated with normal neutrophil function and neurologic impairment. *Amer. J. clin. Path.*, 86: 33-49, 1986.
9. GIACOIA, G.P.; CHOATE, B.P.; GELLIS, S.S. & FEINGOLD, M. — Chediak-Steinbrinck-Higashi syndrome. *Amer. J. Dis. Child.*, 135: 949-950, 1981.
10. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — SÃO PAULO. — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 2ª ed., São Paulo, Tip. Fonseca, 1976.
11. MAURI, C. & SILINGARDI, V. — A cytological and cytochemical study of Chediak's leukocytic anomaly. *Acta haemat.*, 32: 114-126, 1964.
12. MERINO, F.; PAUZA, M. & PURTILO, D.T. — Anti-Epstein-Barr virus memory T-cell response in Chediak-Higashi syndrome patients. *Immunol. Letters*, 12: 51-54, 1986.
13. MILLER, A.L.; STEIN, R.; SUNDSMO, M. & YEH, R.Y. — Characterization of lysosomal enzymes from Chediak-Higashi syndrome cultured fibroblasts. *Biochem. J.*, 238: 589-595, 1986.
14. ROTROSEN, D. & GALLIN, J.I. — Disorders of phagocyte function. *Ann. Rev. Immunol.*, 5: 127-150, 1987.
15. ROZENSZAJN, L.A. & RADNAY, J. — The lysosomal nature of the anomalous granules and chromosome aberrations in cultures of peripheral blood in Chediak-Higashi syndrome. *Brit. J. Haematol.*, 18: 683-689, 1970.
16. RUBIN, C.M.; BURKE, B.A.; McKENNA, R.W.; McCLAIN, K.L.; WHITE, J.G.; NESBIT, M.E. & FILIPOVICH, A.H. — The accelerated phase of Chediak-Higashi syndrome. An expression of the virus-associated hemophagocytic syndrome. *Cancer*, 56: 524-530, 1985.
17. SADAN, N.; YAFFE, D.; ROZENSZAJN, L.; ADAI, H.; SOROKER, B. & EFRATI, P. — Cytochemical and genetic studies in four cases of Chediak-Higashi-Steinbrinck syndrome. *Acta haematol.*, 34: 20-29, 1965.
18. WHITE, J.G. & CLAWSON, C.C. — Chediak-Higashi syndrome: variable cytochemical reactivity of giant inclusions in polymorphonuclear leukocytes. *Ultrastructural Pathol.*, 1: 223-226, 1980.
19. YAM, L.T.; LI, C.Y. & CROSBY, W.H. — Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Amer. J. clin. Path.*, 55: 283-290, 1970.

Recebido para publicação em 16 de fevereiro de 1990.

FREQÜÊNCIA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA HERPES
SIMPLES E CITOMEGALOVÍRUS EM SORO E LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES COM SÍNDROME DE
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA — AIDS*

Maria Isabel de OLIVEIRA**
Suely Pires CURTI**
Mary Eiko SAKUMA**
Ana Maria Sardinha AFONSO**
Cláudia Vaz de AZEVEDO**
José Leopoldo Ferreira ANTUNES**

RIALA6/690

OLIVEIRA, M.I.; CURTI, S.P.; SAKUMA, M.E.; AFONSO, A.M.S.; AZEVEDO, C.V. & ANTUNES J.L.F. — Freqüência de anticorpos específicos para herpes simples e citomegalovírus em soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida — AIDS. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 269-273, 1990.

RESUMO: De janeiro a dezembro de 1988, foram submetidas a exame 865 amostras de soro e 475 amostras de líquido cefalorraquidiano — LCR de pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida — AIDS, para pesquisa de anticorpos específicos para herpes simples e citomegalovírus, respectivamente pelas técnicas de imunofluorescência indireta e fixação do complemento. Dos pacientes estudados, 87,4% eram do sexo masculino e 65,7% pertenciam à faixa etária de 20 a 39 anos; 61,5% das amostras de soro e 7,5% das amostras de LCR apresentaram anticorpos para herpesvírus. Para citomegalovírus, registrou-se a presença de anticorpos específicos em 42,6% das amostras de soro e em 2,7% das amostras de LCR. As freqüências de anticorpos específicos para ambos os vírus nas amostras de soro estudadas foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os valores indicados pela literatura especializada como padrões da população normal. A presença de anticorpos específicos para herpesvírus e citomegalovírus no LCR sugere uma possível infecção por esses vírus no Sistema Nervoso Central dos pacientes com AIDS.

DESCRITORES: citomegalovírus, sorologia; herpes simples, sorologia; líquido cefalorraquidiano; Síndrome de Imunodeficiência Adquirida—AIDS.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana — HIV ocasiona uma perturbação na dinâmica do sistema imune que pode, em seu grau mais severo, predispor o indivíduo infectado a patologias oportunistas, infecciosas ou neoplásicas. Algumas dessas condições clínicas constituem critério diagnóstico para a AIDS, e suas manifestações indicam um mau prognóstico para esses pacientes.

As alterações responsáveis pela emergência dessas patologias afetam vários aspectos da fisiologia do sistema imunológico. A produção de anticorpos frente à invasão ou proliferação de agentes ambientais pode vir a ser deficiente, assim como pode elevar-se anormalmente na ausência de um processo ativo. Embora o controle da produção de anticorpos possa ser perturbado por ação direta do HIV sobre as células B, é provável que essa disfunção seja secundária às alterações em linfócitos T, especificamente em células auxi-

* Realizado no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

liares. São essas células que expressam caracteristicamente a molécula CD4, a qual participa das funções normais dessas células, tendo papel central na regulação imunológica e servindo de receptor para o HIV^{3,13}.

A maior parte das infecções em pacientes com AIDS é causada por reativação de processos anteriores. Infecções oportunistas, tais como as causadas pelo vírus do herpes simples — HSV e por citomegalovírus — CMV, para as quais o paciente já apresentava evidência sorológica de infecção anterior, podem se manifestar de forma aguda, o que sugere uma reativação da infecção prévia. Anticorpos específicos para HSV e CMV são detectados anteriormente à infecção pelo HIV em quase todos os casos, no entanto, o aumento de títulos novos raramente é detectado, devido à dificuldade desses pacientes em produzir anticorpos para novas infecções.

Halbert et alii⁴, em 1986, determinaram a frequência de anticorpos específicos para HSV e CMV em pacientes com AIDS, num valor mais elevado que o apresentado pelo grupo controle constituído como padrão de população normal. Com o objetivo de fornecer dados complementares à literatura biomédica, apresentamos os resultados obtidos nos exames sorológicos efetuados pelo Instituto Adolfo Lutz relativos à detecção de anticorpos específicos para HSV e CMV em pacientes com diagnóstico confirmado de AIDS.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 865 amostras de soro e 475 amostras de LCR de pacientes com AIDS, no período de janeiro a dezembro de 1988, para a pesquisa de anticorpos específicos para HSV e CMV. Todas as amostras provieram de pacientes internados ou atendidos ambulatorialmente no Hospital Emílio Ribas — estabelecimento especializado na assistência aos portadores de moléstias infecciosas. Desses pacientes, 87,4% eram do sexo masculino e 65,7% pertenciam à faixa etária de 20 a 39 anos. Todos eles tiveram confirmado o diagnóstico de AIDS e, em sua maioria, atravessavam a fase terminal da doença no período em que foram coletadas as amostras.

A metodologia empregada na detecção de anticorpos para HSV foi a reação de imunofluorescência indireta⁵, utilizando como antígeno o vírus cultivado em células de linhagem contínua de rim de macaco *vervet* (*Vero*). O controle foi realizado com células não infectadas. A detecção de anticorpos da classe IgG foi feita em diluições seriadas separadamente do soro e do LCR, a partir de 1:8 até 1:64. O título final da reação foi

tomado como a maior diluição do soro ou do LCR que revelasse intensidade de fluorescência igual ou maior ao padrão de duas cruzes (++)

Para a detecção de anticorpos para CMV, foi usada a reação de fixação do complemento¹¹, utilizando como antígeno células fibroblásticas de pulmão de feto humano, linhagem CPF_{III} infectadas, apresentando 75% ou mais de efeito citopático causado pelo vírus. A reação foi realizada em diluições seriadas separadamente do soro e do LCR, a partir de 1:8 até 1:64. Os títulos finais dos anticorpos foram tomados como a maior diluição do soro ou do LCR que exibisse 50% ou menos de hemólise, sendo positivo (ou indicativo da presença de anticorpos para CMV) a partir da diluição maior ou igual a 1:8. Paralelamente, as diluições foram controladas com antígeno normal, isto é, preparado da mesma maneira, porém com células não inoculadas.

Para a análise estatística dos resultados encontrados, foi aplicado o método "t" de Student, com nível de significância estipulado em 95%.

RESULTADOS

Das amostras examinadas, 532 (61,50%) de soro e 35 (7,37%) de LCR apresentaram anticorpos específicos para HSV, como pode ser observado na tabela 1, que mostra a frequência da positividade de anticorpos para cada faixa etária. A taxa mais elevada de positividade nos soros examinados foi registrada para a faixa etária de 30 a 39 anos, enquanto nas amostras de LCR examinadas as taxas mais elevadas correspondem aos grupos de 1 a 9 e 10 a 19 anos. Pela tabela 1 pode-se também perceber que os valores da frequência de positividade para as amostras de LCR mantiveram-se equivalentes nas demais faixas etárias.

A tabela 2 mostra a presença de anticorpos específicos para CMV em 369 (42,66%) amostras de soro e em 13 (2,74%) amostras de LCR. São apresentadas as frequências de positividade de anticorpos para CMV em cada faixa etária. Dentre os grupos de soros examinados, aqueles pertencentes às faixas etárias de 21 a 30 e 31 a 40 anos foram os que apresentaram maior frequência de positividade. Com relação às amostras de LCR analisadas, destaca-se a faixa etária de um a dez anos, que apresentou valor acentuadamente elevado de positividade.

Os índices de frequência por faixa etária da positividade de anticorpos específicos para HSV e CMV no soro da população estudada, composta por pacientes com AIDS, foram objeto de comparação com os valores análogos das frequências

TABELA 1

Frequência de positividade da reação de imunofluorescência indireta para HSV em amostras de soro e LCR de pacientes com AIDS, por faixa etária.

Faixa Etária (anos)	Amostras de soro		Amostras de LCR	
	Total	Positivas	Total	Positivas
menos de 1	14	6(42,86%)	2	0(0,00%)
01 a 09	18	5(27,78%)	6	1(16,67%)
10 a 19	65	41(63,08%)	17	2(11,76%)
20 a 29	320	179(55,94%)	161	11(6,83%)
30 a 39	254	181(71,26%)	145	9(6,21%)
40 ou mais	105	67(63,81%)	63	4(6,35%)
sem informação	89	53(59,55%)	81	8(9,88%)
Total	865	532(61,50%)	475	35(7,37%)

TABELA 2

Frequência de positividade da reação de fixação de complemento para CMV em amostras de soro e LCR de pacientes com AIDS, por faixa etária.

Faixa Etária (anos)	Amostras de Soro		Amostras de LCR	
	Total	Positivas	Total	Positivas
menos de 1	14	3(21,42%)	2	0(0,00%)
01 a 10	19	7(36,84%)	6	1(16,67%)
11 a 20	76	30(39,47%)	25	1(4,00%)
21 a 30	322	144(44,72%)	172	4(2,33%)
31 a 40	242	107(44,21%)	132	2(1,52%)
41 ou mais	101	42(41,58%)	57	1(1,75%)
sem informação	91	36(39,56%)	81	1(4,94%)
Total	865	369(42,66%)	475	13(2,74%)

descritas pela literatura especializada^{1,12} como sendo os padrões para a população normal da cidade de São Paulo. A diferença de amplitude entre as faixas etárias das tabelas 1 e 2 obedeceu às diferentes classificações estabelecidas pela literatura especializada para os padrões de referência normal. Como resultado dessa análise comparativa, pôde-se observar que a frequência de ambos os anticorpos específicos foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo das amostras de soro da população composta por pacientes com AIDS.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo estatístico revelou que os valores da frequência de positividade de anticorpos es-

pecíficos para HSV e CMV no soro dos pacientes com AIDS foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores relativos ao soro da população normal. Ao contrário das observações de Halbert et alii⁴, no entanto, os dados que ora se apresentam indicaram taxas relevantemente menores para o grupo composto por pacientes com AIDS, o que talvez possa ser explicado pelo fato de a maioria desses indivíduos estarem atravessando a fase terminal da doença. Esse achado indica que a infecção pelo HIV interfere na produção ou na manutenção desses anticorpos ou, ainda, contribui para sua queda a níveis não detectáveis ou até mesmo seu desaparecimento.

McVoy et alii⁸ afirmam que a reativação de CMV em pacientes imunocomprometidos pode

ocorrer frequentemente, em proporções crescentes com a idade, fato que também pode ser observado nos resultados da presente pesquisa.

O diagnóstico clínico de encefalite ou meningoencefalite causada por HSV ou CMV é muitas vezes difícil e necessita de confirmação através de exames laboratoriais complementares, tais como a pesquisa de anticorpos específicos no LCR, a detecção de vírus em material de biópsia ou exames anátomo-patológicos. Os resultados encontrados indicam a presença de anticorpos es-

pecíficos para HSV em 35 (7,37%) e para CMV em 13 (2,74%) das amostras de LCR analisadas. Estes resultados são sugestivos de comprometimento do Sistema Nervoso Central por esses vírus nos pacientes com AIDS^{6,9,14}.

Agradecimentos

Ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes e ao Dr. Luís Fernando M. Brígido, pela colaboração e sugestões recebidas durante a redação deste trabalho.

RIALA6/690

OLIVEIRA, M.I.; CURTI, S.P.; SAKUMA, M.E.; AFONSO, A.M.S.; AZEVEDO, C.V. & ANTUNES, J.L.F. — Herpes simplex virus and cytomegalovirus antibodies frequency in serum and cerebrospinal fluid from patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome — AIDS. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(12): 269-273, 1990.

ABSTRACT: From January to December, 1988, 865 serum samples and 475 cerebrospinal fluid — CSF samples from patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome — AIDS were evaluated for the presence of antibodies to Herpes simplex virus — HSV and cytomegalovirus — CMV, using, respectively, indirect immunofluorescence and complement fixation techniques. From the received samples, 87.4% came from males and 65.7% came from people aged 20 to 39 years old. 61.5% of the serum samples and 7.5% of the CSF samples showed HSV antibodies. Detection of CMV antibodies revealed positive results in 42.6% serum samples and 2.7% CSF samples. Comparative analysis between these serum data and the results obtained from normal population (according to medical literature) showed a diminished frequency of antibodies in the studied group ($p < 0.05$). The presence of specific antibodies to herpes simplex virus or cytomegalovirus in the CSF of the patients with AIDS suggests a possible infection of the Central Nervous System by these viruses.

DESCRIPTORS: Herpes simplex virus, serology; cytomegalovirus, serology, Acquired Immunodeficiency Syndrome — AIDS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARVALHO, R.P.S.; PANNUTI, C.S.; AMATO NETO, V.; OSELKA, G.W. & ANGELO, M.J.O. — Estudo soro-epidemiológico da infecção pelo citomegalovírus em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop., S. Paulo*, 18: 1-5, 1976.
2. EPSTEIN, J.S.; FREDERICK, W.R.; ROOK, A.H.; JACKSON, L.; MANISCHEWITS, J.F.; MAYNER, R.E.; MASUR, H.; ENTERLINE, J.C.; DJEU, J.Y. & QUINNAN Jr, G.V. — Selective defects in cytomegalovirus - and mitogen-induced lymphocyte proliferation and interferon release in patients with Acquired Immuno Deficiency Syndrome. *J. Infect. Dis.*, 152: 727-32, 1985.
3. GOLD, J.W.M. - Clinical spectrum of infections in patients with HTLV-III associated diseases. *Cancer Res.*, 45(suppl): 4652-4, 1985.
4. HALBERT, S.P.; KIEFER, D.J.; FRIEDMAN-KIEN, A.E. & POIESZ, B. Antibody levels for cytomegalovirus, Herpes simplex virus and Rubella in patients with Acquired Immuno Deficiency Syndrome. *J. clin. Microbiol.*, 23: 318-21, 1986.
5. KAPLAN, M.H.; PAHWA, S.G.; POPOVIC, M.; SARNGADHRAN, M.G. & GALLO, R.C. — A classification of HTLV-III infection based on 75 cases seen in a suburban community. *Cancer Res.*, 45 (suppl): 4655-8, 1985.
6. LOON, A.M.V.; LOGT, J.T.M.V.D.; HEESSEN, F.W.A.; POSTMA, B. & PEETERS, M.F. — Diagnosis of Herpes simplex virus encephalitis by detection of virus specific immunoglobulins A and G in serum and cerebrospinal fluid by using an antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. clin. Microbiol.*, 27: 1983-7, 1989.
7. MELBYE, M.; BIGGAR, R.J.; EBBESEN, P.; ANDERSEN, H.L.S. & VESTERGAARD, B.F. — Lifestyle and antiviral antibody studies among homosexual men in Denmark. *Acta path. microbiol. immunol. scand.*, 91: 357-67, 1983.
8. McVOY, M.A. & ADLER, S.P. — Immunologic evidence for frequent age-related cytomegalovirus re-

- activation in seropositive immunocompetent individuals. *J. infect. Dis.*, 160:1-10, 1989.
9. NIELSEN, S.L.; PETITO, C.K.; URMACHER, C.D. & POSNER, J.B. — Subacute encephalitis in Acquired Immuno Deficiency Syndrome: A postmortem study. *Amer. J. clin. Path.*, 82: 678-82, 1984.
10. ROOK, A.H. — Interactions of cytomegalovirus with the human immune system. *Rev. infect. Dis.*, 10 (suppl.): 460-7, 1988.
11. RONALDS, C.J.; HARDMAN, A.E. & GRIFFITHS, P.D. — Hotting-up the complement fixation test. *J. Hyg.*, 90: 127-34, 1983.
12. SALLES-GOMES, L.F.; SAKUMA, M.E. & CURTI, S.P. — *Herpesvirus hominis*: Estado atual da frequência dos anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41: 107-14, 1981.
13. SELIGMANN, M.; PINCHING, A.J.; ROSEN, F.S.; FAHEY, J.L.; KHAITOV, R.M.; RIETHMÜLLER, G. & SPIRA, T. — Immunology of human immunodeficiency infections and the acquired immunodeficiency. *Ann. intern. Med.*, 107: 234-42, 1987.
14. WILEY, C.A. & NELSON, J.A. — Role of human immunodeficiency virus and Cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Amer. J. Pat.*, 133: 73-81, 1988.

Recebido para publicação em 19 de fevereiro de 1990.

EXPRESSÃO ANTIGÊNICA E DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS: UM ESTUDO COMPARATIVO.

Cynthia Bomfim PESTANA*
Paulo Cyrillo CARDOSO DE ALMEIDA**

RIALA 6/691

PESTANA, C.B. & CARDOSO DE ALMEIDA, P.C. — Expressão antigênica e diferenciação morfológica de neoplasias mamárias: um estudo comparativo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 275-279, 1990.

RESUMO: Foram selecionados quatro carcinomas ductais invasivos de mama com graus de anaplasia progressivos e testados por métodos imuno-histoquímicos para marcadores de diferenciação mamária com o objetivo de verificar a correlação entre grau histológico e a presença desses marcadores. Foram utilizados anticorpos contra alfa-lactoalbumina, lactoferrina, caseína, componente secretor, antígeno epitelial de membrana e antígeno carcinoembrionário. A neoplasia mais diferenciada resultou positiva para todos os antígenos pesquisados, enquanto a neoplasia menos diferenciada resultou negativa, com exceção da alfa-lactoalbumina. As neoplasias com diferenciação intermediária apresentaram coloração focal nas áreas mais diferenciadas da lesão. Uma correlação entre a expressão dos antígenos de diferenciação celular mamária e uma boa diferenciação histológica foi verificada para a maioria dos marcadores utilizados.

DESCRITORES: imunoperoxidase; alfa-lactoalbumina; lactoferrina; caseína; componente secretor antígeno epitelial de membrana; antígeno carcinoembrionário.

INTRODUÇÃO

Os métodos imuno-histoquímicos têm sido amplamente utilizados no sentido de investigar a síntese de diversos marcadores biológicos e associá-los às características específicas do tumor e ao grau de diferenciação celular. No estudo das neoplasias mamárias, esses marcadores, além de possibilitar um melhor entendimento da doença, podem ser particularmente úteis no fornecimento de informações quanto à atividade secretória e grau de diferenciação celular, assim como na avaliação prognóstica da lesão. Dentre esses marcadores encontram-se as proteínas do leite, produtos de secreção e proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite. As proteínas do leite, caseína, lactoalbumina e lactoferrina, são sintetizadas pelas células epiteliais mamárias bem diferenciadas, aumentando seus níveis durante a lactação e diminuindo a seguir e, portanto, são considerados bons marcadores da diferenciação

celular mamária, assim como o componente secretor, uma glicoproteína de secreção presente no epitélio mamário normal¹⁹. Essas proteínas foram demonstradas em carcinomas de mama e em cultura de células de carcinoma de mama, mas a relação de sua síntese e uma boa diferenciação histológica do tumor é ainda muito discutida^{4,10,16}. Alguns anticorpos foram produzidos contra a membrana do glóbulo de gordura do leite, mas seu grau de especificidade em relação ao tecido mamário parece ser variável¹³.

Por outro lado, os marcadores considerados de "desdiferenciação" celular, como as proteínas oncofetais e placentárias, parecem estar relacionados a um comportamento mais agressivo do tumor, podendo trazer informações prognósticas importantes¹⁹. Algumas publicações sugerem haver uma relação entre a imuno-reatividade do antígeno carcinoembrionário (CEA) e um pior prognóstico^{5,9,14}. A correlação entre a presença

* Da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

** Da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas/FMUSP.

desse antígeno e uma boa diferenciação histológica têm apresentados resultados conflitantes^{15,17}. Vários estudos têm sido realizados no sentido de correlacionar os marcadores de diferenciação e o grau histológico. No entanto, a análise conjunta de vários marcadores utilizando a mesma casuística não tem sido efetuada nesses trabalhos.

Nosso objetivo no presente trabalho foi estudar a relação entre alguns marcadores biológicos tidos como específicos para mama e outros considerados marcadores de "desdiferenciação" celular e o grau de diferenciação morfológica, baseando-se na análise de quatro casos selecionados e em dados de leitura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados quatro casos de carcinoma ductal invasivo de mama de diferentes graus histológicos devido a suas características morfológicas peculiares.

Caso I — Paciente de 72 anos com tumor no estágio III infiltrando a pele e três linfonodos positivos em vinte e oito dissecados. O estudo histológico revela uma neoplasia bem diferenciada, caracterizada por elementos epiteliais atípicos dispostos em grupamentos sólidos ou estruturas tubulares, com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo bem diferenciado.

Caso II — Paciente de 62 anos com tumor no estágio II e apenas um dos trinta e três linfonodos examinados positivo. O estudo histológico revela uma neoplasia com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo pouco diferenciado, menos diferenciada que a anterior e caracterizada por elementos epiteliais de grande tamanho de núcleo e citoplasma abundante, tendendo a formar blocos sólidos.

Caso III — Paciente de 44 anos com tumor no estágio VI e dois linfonodos positivos em 45 dissecados. O estudo histológico revela uma neoplasia menos diferenciada do que as duas anteriores, caracterizada por elementos epiteliais de núcleos irregulares e citoplasma escasso, dispostos em blocos sólidos ou em cordões, com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo pouco diferenciado.

Caso IV — Paciente de 40 anos com tumor em estágio não determinado, cujo estudo histológico revela uma neoplasia indiferenciada, com áreas anaplásicas que podem ser confundidas com sarcoma, caracterizadas por elementos epiteliais pequenos e citoplasma escasso, com diagnóstico de carcinoma indiferenciado.

Cortes histológicos dos quatro espécimes fixados em formol e incluídos em parafina foram corados pelo método da avidina-biotina-peroxidase⁷, utilizando-se os seguintes anticorpos obtidos em coelho: anti-alfa-lactoalbumina, antilactoferrina, anti-antígeno carcinoembrionário (CEA), anticomponente secretor e anticaseína. O anticorpo monoclonal anti-antígeno epitelial de membrana (EMA) foi produzido em camundongo. Todos os anticorpos foram adquiridos à Dako (Santa Bárbara, CA), com exceção do anticorpo anticaseína, que nos foi gentilmente cedido pelo Prof. Gianni Bussolati, da Universidade de Turim.

Resumidamente, os cortes histológicos, após desparafinização e hidratação progressiva, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 0,3% e das reações inespecíficas com soro normal de cabra ou de cavalo 2% em solução salina tamponada com fosfatos (PBS). As lâminas foram então incubadas consecutivamente com soro primário por 1 hora a 37°C, com os anticorpos biotinilados produzidos em cabra ou cavalo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 30 minutos e finalmente com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector) por mais 30 minutos. Entre as incubações, as lâminas foram lavadas por dez minutos em PBS. O substrato utilizado foi a 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) 0,03% com peróxido de hidrogênio em PBS e a contra coloração com hematoxilina de Mayer. Depois de desidratadas, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá. Como controle positivo da reação, foi processado um fragmento de tecido sabidamente positivo (mama secretante) e, como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune da espécie em que este foi produzido, mantidas as demais etapas da reação.

RESULTADOS

Os resultados imuno-histoquímicos dos diversos marcadores nos quatro carcinomas de mama encontram-se sumarizados na tabela 1.

TABELA

Resultados imuno-histoquímicos nos quatro carcinomas de mama estudados.

	CASO I	CASO II	CASO III	CASO IV
αlactoalbumina	+	-	-	+
caseína	+	+	+	-
lactoferrina	+	+	+	-
componente secretor	+	+	+	-
EMA	+	+	+	-
CEA	+	+	+	-

O caso I resultou positivo para todos os marcadores estudados. As proteínas do leite, no entanto, apresentaram-se fraca ou focalmente positivas nos blocos sólidos, sendo mais fortemente positivas nas células neoplásicas formando ductos. A lactoferrina foi fortemente positiva na luz dessas estruturas. O componente secretor resultou fortemente positivo na maioria das células neoplásicas, assim como o EMA. As preparações coradas com anti-EMA mostraram, na maioria das vezes, positividade na membrana que delinea a superfície de diversas células que revestem os espaços luminares. CEA resultou positivo nas células neoplásicas que formam ductos e fraca, focalmente positivo ou negativo nas células dos grupamentos sólidos.

No caso II, lactoferrina e caseína apresentaram positivas nas células neoplásicas que formam ductos esparsos em meio a neoplasia, enquanto alfa-lactoalbumina resultou negativa. O componente secretor foi focalmente positivo nas áreas de blocos sólidos e EMA resultou positivo na maior parte das células dessas áreas. Anti-CEA corou poucas células em meio a neoplasia.

No caso III, lactoferrina e caseína resultaram fortemente positivos nas células que formam pequenos ductos e cordões em meio a neoplasia. Alfa-lactoalbumina resultou negativa. EMA e o componente secretor coraram fortemente as células neoplásicas da luz das estruturas tubulares e a maior parte das células formando blocos ou cordões. Algumas estruturas neoplásicas foram negativas. A coloração intensa das células tanto normais, quanto neoplásicas na luz dos túbulos, é também observada com a utilização de anti-CEA.

O caso IV apresentou-se negativo para lactoferrina, caseína, componente secretor, EMA e CEA. Alfa-lactoalbumina resultou positiva na área menos anaplásica do tumor.

DISCUSSÃO

Estudos no sentido de determinar uma correlação entre antígenos de diferenciação mamária e diferenciação morfológica (grau histológico) por métodos imuno-histoquímicos têm apresentado resultados controversos entre os diversos autores. A presença de alfa-lactoalbumina parece não ter correlação com uma boa diferenciação histológica. WALKER¹⁶, analisando 100 carcinomas de mama, encontrou 50% dos carcinomas bem diferenciados produtores de alfa-lactoalbumina, mas apenas 35% dos poucos diferenciados foram positivos. Esses resultados são confirmados por CLAYTON et alii³. Nossos resultados estão de acordo com esses achados, uma vez que o caso IV (carcinoma indiferenciado) resultou positivo e os casos II e III, que são pouco

diferenciados, resultaram negativos. No entanto, WALKER¹⁶ não observou correlação entre as áreas de coloração e estrutura do tumor e, no nosso estudo, as células dispostas em estruturas ductais, portanto mais diferenciadas, apresentam positividade muito mais intensa do que outras estruturas, não só para alfa-lactoalbumina (caso I) como para outros marcadores (casos I, II e III).

Os resultados utilizando lactoferrina como marcador são mais variados. HURLIMANN et alii⁸, examinando a síntese de lactoferrina em 43 carcinomas por imunofluorescência e utilizando culturas de tecido, encontraram uma correlação positiva entre a síntese e a diferenciação dos tumores. Por outro lado, WALKER¹⁸, utilizando o método da imunoperoxidase, não observou essa correlação nos 55 carcinomas analisados. CHARPIN et alii² observaram positividade mais freqüente em carcinomas ductais de baixo grau histológico, mas o número de casos não permitiu estabelecer uma diferença significativa. Em nosso estudo, apenas o tumor indiferenciado não apresentou nenhuma positividade para a lactoferrina, o que concorda com dois dos três estudos citados.

A relação entre a síntese de caseína e a diferenciação morfológica dos carcinomas é muito discutida. Dois estudos^{1,12} observaram positividade para caseína em todos os carcinomas grau I, ou bem diferenciados, enquanto os pouco diferenciados, grau III, apresentaram-se raramente positivos. Outros resultados, porém, foram relatados. FORTT et alii⁴, numa amostragem maior encontraram positividade freqüente em carcinomas pouco diferenciados. WOODS et alii¹⁰, analisando soro de pacientes com câncer de mama, não encontraram correlação entre a presença de caseína e diferenciação tumoral. Os resultados obtidos por diferentes autores na década passada com relação a caseína devem, no entanto, ser analisados com extremo cuidado, uma vez que, em 1982, ORMEROD et alii¹¹, comparando anti-soros anti-caseína e anti-EMA, demonstraram que muitos dos determinantes detectados pelos dois anti-soros eram idênticos, e que as preparações de anticaseína estavam freqüentemente associadas a pequenas quantidades de EMA. O anti-soro utilizado nesse estudo foi absorvido com EMA e ainda assim, três dos quatro carcinomas apresentaram algumas células positivas localizadas principalmente nas estruturas ductais dos tumores, sugerindo, desse modo, a presença de caseína em áreas mais diferenciadas e ausência em carcinomas indiferenciados.

HURLIMANN et alii⁸ concluíram não haver correlação entre a positividade do componente secretor e boa diferenciação histológica. Essa relação, no entanto, foi observada em outro estu-

do³, no qual a incidência de positividade dos tumores bem diferenciados não foi alta (58%), mas apenas um pequeno número de carcinoma pouco diferenciado corou-se. Novamente nossos resultados sugerem haver uma relação entre esses parâmetros, uma vez que apenas o carcinoma indiferenciado não apresentou positividade.

Os anticorpos contra as proteínas da membrana do glóbulo do leite reconhecem uma proteína que é expressa pela maioria das células mesoteliais e epiteliais e está presente em muitos carcinomas, mesmo quando indiferenciados ou anaplásicos¹⁸. Um desses anticorpos parece ter maior especificidade pelo epitélio mamário normal e neoplásico¹³, mas não foi utilizado nesse estudo. A negatividade do caso IV (carcinoma indiferenciado) não confirma essas observações e sugere haver correlação entre a positividade de EMA e uma diferenciação glandular do tumor.

Nossas observações em relação à positividade de CEA concordam com WALKER¹⁷, que encontrou uma correlação entre a presença desse antígeno e uma boa diferenciação histológica num estudo de 100 carcinomas de mama. Isso não foi confirmado num estudo posterior com 35 pacientes¹⁵. Dos quatro tumores analisados, ape-

nas o tumor bem diferenciado (caso I) apresentou coloração para a maioria das células. Os tumores menos diferenciados (casos II e III) apresentaram poucas células coradas e o tumor indiferenciado (caso IV) foi totalmente negativo, sugerindo haver uma perda progressiva desse antígeno à medida que a lesão torna-se menos diferenciada.

As principais variações entre os diversos estudos de marcadores de diferenciação parecem ser devidas aos diferentes anticorpos primários utilizados¹⁹. Outros fatores como fixação, uso de enzimas proteolíticas e diferentes métodos imunohistoquímicos podem também influenciar os resultados finais.

Concluindo, os achados imuno-histoquímicos desse estudo sugerem haver uma correlação entre os aspectos morfológicos da diferenciação tumoral (grau histológico) e a expressão pelas células neoplásicas de antígenos próprios da diferenciação das células do epitélio mamário. Esses resultados concordam com parte significativa dos dados encontrados na literatura e deverão ser corroborados em um maior número de casos, buscando-se, também, uma associação com formas clínicas evolutivas.

PESTANA, C.B. & CARDOSO-de-ALMEIDA, P.C. — Antigenic characters and morphologic differences of the mammary neoplasms: a comparative study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 275-279, 1990.

ABSTRACTS: Four cases of human breast carcinomas were selected and tested for the presence of breast epithelial cell differentiation. Antisera to alpha-lactalbumin, lactoferrin, casein, secretory component, epithelial membrane antigen and carcinoembryonic antigen were employed. The well differentiated tumor was positive for all markers tested while the less differentiated one was negative except for alpha-lactalbumin. The intermediate tumors presented focal staining in the more differentiated areas. A relationship was found between the presence of markers of breast differentiation and good histological differentiation of tumors. No particular correlation was noted when alpha-lactalbumin was employed.

DESCRIPTORS: immunoperoxidase; alpha-lactalbumin; lactoferrin; casein secretory component; epithelial membrane; antigen and carcinoembryonic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUSSOLATI, G.; PICH, A. & ALFANI, V. — Immunofluorescence detection of casein in human mammary dysplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch (A)*, 365: 15-21, 1975.
2. CHARPIN, C.; LACHARD, A. & PORREAU-SCHNEIDER, N. — Localization of lactoferrin and nonspecific cross-reacting antigen in human breast carcinomas. *Cancer*, 55: 2612-2617, 1985.
3. CLAYTON, F.; ORDONEZ, N.G.; HANSEN, G.M. & HANSEN, H. — Immunoperoxidase localization of lactalbumin in malignant breast neoplasms. *Arch. Path. Lab. Med.* 106: 268-270, 1982.
4. FORTT, R.W.; GIBBS, A.R.; WILLIAMS, D.; HANSEN, J. & WILLIAMS, L. — The identification of casein in human breast cancer. *Histopathology* 3: 395-406, 1979.
5. HEGG, R.; PESTANA, C.B.; ZECCHI DE SOUZA, A. & CARDOSO DE ALMEIDA, P.C. — Tissue carcinoembryonic antigen in early breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 15: 213-216, 1990.
6. HEYDERMAN, F.; STEELE, K. & ORMEROD, M.G. — A new antigen on the epithelial membrane: its immunoperoxidase localization in normal and neoplastic tissue. *J. clin. Path.* 32: 35-39, 1979.
7. HSU, S.M.; RAINE, L. & FANGER, H. — Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.
8. HURLIMANN, J.; LICHAA, M. & OZZELLO, L. — In vitro synthesis of immunoglobulins and other proteins by dysplastic and neoplastic human mammary tissues. *Cancer Res.* 36: 1284-1292, 1976.
9. KUHADJA, F.J.; OFFUTT, L.E. & MENDELSON, G. — The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma. *Cancer*, 52: 1257-1264, 1978.
10. MASON, D.Y. & TAYLOR, C.R. — Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissue. *J. clin. Path.*, 31: 316-327, 1978.
11. ORMEROD, M.G.; BUSSOLATI, G.; SLOANE, J.P.; STEELE, K. & GUGLIOTTA, P. — Similarities of antisera to casein and epithelial membrane antigen. *Virchows Arch. (A)*, 397: 327-333, 1982.
12. PICH, A.; BUSSOLATI, G. & CARBONARA, A. — Immunocytochemical detection of casein and casein-like proteins in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 940-944, 1976.
13. RUSSO, J. & RUSSO, I.M. — Immunocytochemical markers in breast cancer. In: De LELLIS R. eds. *Advances in Immunohistochemistry*. New York, Raven, 1988. 431-475.
14. SHOUSA, S.; LYSSIOTIS, T., GODFREY, V.M. & SCHEVER, P.J. — Carcinoembryonic antigen in breast cancer tissue: a useful prognostic indicator. *Brit. Med. J.* 1: 777-779, 1978.
15. VAN DER LINDEN, J.C.; BAAK, J.P.; LINDEMAN, J.; SMEULDERS, A.W.M. & MEYER, C.J.L. — Carcinoembryonic antigen expression and peanut agglutinin binding in clinical, histopathological, biochemical and morphometric features. *Histopathology*, 9: 1051-1059, 1985.
16. WALKER, R.A. — The demonstration of alpha-lactalbumin in human breast carcinomas. *J. Path.*, 129: 37-42, 1979.
17. WALKER, R.A. — Demonstration of carcinoembryonic antigen in human breast carcinomas by the immunoperoxidase technique. *J. clin. Path.*, 33: 356-360, 1980.
18. WALKER, R.A. — Differentiation of human breast carcinomas: an immunohistological study of appropriate and inappropriate protein production. *J. Path.*, 137: 109-117, 1982.
19. WALKER, R.A. — Immunohistochemistry of biological markers of breast carcinoma. In: De LELLIS R. *Advances in immunohistochemistry*. New York, Masson Pub., 1984, p. 223-241.
20. WOODS, R.L.; SEARLE, R.; WILSON, R.; BHAGSHAW, K. D. & COOPER, E.H. — Serum kappa-casein in breast cancer. *Eur. J. Cancer.*, 13: 1113-1117, 1970.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.



MUCOPROTEÍNAS: NOVAS CONTRIBUIÇÕES PARA UM PROBLEMA LABORATORIAL

Heidi Pinto MARTINS*
Irene Mara ZAMBONI**
Mary Mitiko YUKI*
Lucia Nassi CASTILHO*

RIALA6/692

MARTINS, H.P.; ZAMBONI, I.M.; YUKI, M.M. & CASTILHO, L.N. — Mucoproteínas: novas contribuições para um problema laboratorial. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 281-283, 1990.

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da concentração do ácido perclórico e da temperatura de desproteinização, na determinação das mucoproteínas séricas. Como o doseamento das mucoproteínas possui importância clínica no acompanhamento de doenças infecciosas e de vários distúrbios metabólicos, exige-se, desta forma, um controle minucioso de fatores externos que possam interferir na sua quantificação.

DESCRIPTORIOS: mucoproteínas; diluição do ácido perclórico; temperatura de desproteinização.

INTRODUÇÃO

Winzler, em 1958⁹, propôs uma das melhores classificações das proteínas contendo carboidratos, dividindo-as em dois grandes grupos: mucoproteínas e glicoproteínas. As mucoproteínas foram definidas como proteínas combinadas com mucopolissacarídeos (polissacarídeos contendo hexosamina e ácido urônico ou sulfúrico) numa ligação polar.

As mucoproteínas representam uma fração heterogênea das proteínas solúveis que podem ser separadas por eletroforese em cinco subfrações de acordo com sua mobilidade⁴. Essa heterogeneidade foi demonstrada por imunoeletroforese e por cromatografia⁵.

Em 1948, WINZLER et al.⁷ descreveram a técnica de doseamento das mucoproteínas baseada na solubilidade seletiva das proteínas em ácido perclórico diluído e, na posterior precipitação pelo ácido fosfotúngstico. Devido à co-

precipitação de outras proteínas séricas com o ácido perclórico, a recuperação das mucoproteínas por este sistema é cerca de 70%⁷. A extensão da co-precipitação depende de vários fatores como a diluição do soro e do ácido perclórico, do método de agitação utilizado, do tempo e da temperatura de contato entre o sobrenadante e as proteínas precipitadas e da concentração de NaCl na diluição do soro

Outra possível causa de baixa recuperação é a absorção das mucoproteínas ao papel de filtro³, causa esta pouco estudada até hoje.

A temperatura de precipitação das proteínas também é fator importante para que a determinação das mucoproteínas seja precisa, sendo que a temperatura não deve exceder a 24°C. Em temperaturas superiores, deve-se utilizar banho de gelo para efetuar a precipitação.

Segundo Greenspan², os resultados obtidos com plasma são cerca de 30% mais baixos do que os ob-

* Pesquisadoras do Instituto Adolfo Lutz.

** Técnica de Laboratório do IAL.

TABELA 1

Comparação dos resultados da determinação de mucoproteínas (mg/dl de tirosina), utilizando-se diferentes concentrações de ácido perclórico em "pool" de SCN.

	"kit"	0,67N	0,75N	0,90N	1,20N
muco	4,08 ± 0,43	3,91 ± 0,32	3,77 ± 0,30	3,43 ± 0,20*	3,48 ± 0,32*

* P < 0,05 vs. "kit" específico.

n = < 20 em cada concentração de ácido perclórico.

tidos com soro, variando ainda com o tipo de anti-coagulante utilizado. As mucoproteínas séricas permanecem estáveis por dois a sete dias a 4°C.

O aumento das mucoproteínas ocorre em vários processos patológicos agudos ou crônicos, como neoplasias, doença do colágeno, tuberculose e doenças infecciosas, diabetes mellitus, cirrose hepática, psoríase, gota⁶ etc. Por outro lado, a diminuição dos níveis séricos de mucoproteínas ocorre apenas na síndrome nefrótica⁸.

Baseados nestas considerações, estudamos a influência de diferentes concentrações de ácido perclórico, bem como da temperatura de desproteínização na precisão da dosagem sérica de mucoproteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos a técnica clássica proposta por WINZLER et al.⁷, com algumas modificações, como a seguir:

A 1 ml de soro acrescentar 9 ml de ácido perclórico 0,67 N e agitar. Após exatamente dez minutos (temperatura inferior a 24°C) filtrar em papel de filtro Whatman nº 50 ou equivalente (às vezes se faz necessário refiltrar no mesmo papel de filtro). Em seguida, colocar 3 ml do filtrado em tubo de centrífuga, e adicionar 0,6 ml de ácido fosfotúngstico 5%. Misturar e esperar dez minutos. Centrifugar e descartar o sobrenadante. Dissolver o precipitado em 5 ml de carbonato de sódio 0,57 N. Fazer um branco com 50 µl de água destilada e um padrão usando 50 µl de solução padrão de tirosina (40mg/dl). Adicionar a todos os tubos 0,2 ml de reativo de Folin (1:2,5). Agitar, colocar em banho-maria a 37°C e esperar por 15 minutos. Esfriar os tubos e efetuar as leituras espectrofotométricas a 680 nm, ignorando alguma turbidez (efeito Tyndall positivo). Os resultados são expressos em mg/dl de tirosina.

Foi utilizado um "pool" de soro controle normal (SCN) armazenado a 4°C por 24 a 48 horas.

TABELA 2

Comparação dos resultados da determinação de mucoproteínas (mg/dl de tirosina) em diferentes faixas de temperatura de desproteínização em "pool" de SCN.

	Temperatura de desproteínização	
	16 a 23°C	24 a 32°C
muco	4,21 ± 0,35	3,15 ± 0,41*

* p < 0,05.

n = 62 em cada faixa de temperatura.

Estudamos: 1) variação dos resultados com diferentes concentrações de ácido perclórico entre 0,67 e 1,2 N; as amostras também foram dosadas por "kit" específico, 2) a influência da temperatura na precipitação das proteínas, efetuando-se determinações simultâneas em temperaturas entre 16 e 23°C e na faixa de 24 a 32°C, mantendo-se neste caso a concentração do ácido perclórico constante ("kit").

A análise estatística dos resultados foi efetuada pelo teste "t" de Student e o nível de significância estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Na tabela 1 apresentamos os resultados da mucoproteína sérica obtidos em "pool" de soro controle normal (SCN), com diferentes concentrações de ácido perclórico.

Os resultados obtidos com diferentes temperaturas de precipitação estão apresentados na tabela 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Tem sido relatado que o método proposto por WINZLER em 1948⁷, apresenta certas limitações

na obtenção de valores precisos dos níveis séricos de mucoproteínas. A despeito disso, ainda hoje, é o método preconizado pela maioria dos laboratórios clínicos.

Nossos resultados mostraram que a melhor recuperação da mucoproteína ocorre em concentrações de ácido perclórico entre 0,67 e 0,75 N, valores estes compatíveis aos obtidos com "kit" específico (tabela 1). Concentrações do desproteinizante acima destes valores mostraram menor recuperação das mucoproteínas, fornecendo resultados significativamente mais baixos.

Na tabela 2 podemos observar que o controle

da temperatura deve ser rígido, pois pequenas elevações durante o processo de desproteíntização levam a subestimação dos resultados.

Cabe ressaltar que estes valores falsamente baixos, resultantes da utilização de uma concentração inadequada de ácido perclórico e da desproteíntização em temperaturas elevadas, podem levar a um diagnóstico errôneo.

Portanto, sendo a determinação seriada de mucoproteínas um instrumento útil para o clínico no direcionamento da conduta terapêutica, é de fundamental importância garantir a precisão dos resultados, através da minimização de possíveis causas de erro.

RIALA6/692

MARTINS, H.P.; ZAMBONI, I.M.; YUKI, M.M. & CASTILHO, L.N. — Mucoproteins: new assessments for a laboratorial problem. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 281-283, 1990.

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the influence of perchloric acid concentration and temperature at the precipitation step on the determination of mucoproteins. Our results showed that the increase of perchloric acid concentration as well as of the temperature produce underestimated values of serum mucoproteins. Duto the clinical significance of the mucoproteins dosage for the accompaniment of patients with infectious diseases and metabolic disturbances, it is required a detailed control of external factors which can interfere on its quantification.

DESCRIPTORS: mucoproteins, acid perchloric dilution, precipitation temperature.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOGDANIKOWA, B.; BERNACKA, K. & DROZD, J. — Immunoelktrophorese der perchlorsaurelöslichen serumproteine. *Clin. chim. Acta*, 13:221-7, 1966.
2. DOCK, W. & SNAPPER, I. — *Advances in internal medicine*. Chicago, Yr. Bk. Pub., 1955. v. 7, p. 101.
3. LEDVINA, M. & COUFALOVA, S. — Adsorption of blood serum mucoproteins on filter paper. *Clin. chim. Acta.*, 6:16-21, 1961.
4. MORAWIECKA, B. & MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, W. — The quantitative determination of human seromuroid fractions in paper electrophoresis. *Clin. chim. Acta*, 7:722-8, 1962.
5. PRICE, W.H.; MATANOSKI, G.M.; MORRISON, D.; PREWER, A. & WAGNER, G. — The fractionation of seromuroids from human serum. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 108:227-41, 1961.
6. SPIRO, R.G. — Glycoproteins: their biochemistry, biology and role in human disease. *New Engl. J. Med.*, 281:991-1001, 1969.
7. WINZLER, R.J. & SMYTH, I.M. — Studies on mucoproteins of human plasma; plasma mucoprotein levels in cancer patients. *J. clin. Invest.*, 27:617-9, 1948.
8. WINZLER, R.J. - Determination of serum glycoproteins. In: GLICK D. ed. — *Methods of Biochemical Analysis*. New York, Interscience, 1955. v. 2, p. 279.
9. WINZLER R.J. — Glycoproteins of plasma. In: WOLSTYENHOLME, G.E.W. & O'CONNOR, M. — *Ciba Foundation Symposium on the chemistry and biology of mucopolysaccharides*. Boston, Churchill, 1958. p. 245-267.

Recebido para publicação em 12 de março de 1990.

QUANTIFICATION OF LYMPHOCYTE SUBSETS IN AIDS
ASSOCIATED WITH SUSPECTED CYTOMEGALOVIRUS
INFECTION*

Adele CATERINO-DE-ARAUJO**
Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA**
Mirthes UEDA**

RIALA6/693

CATERINO-de-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E. DE LOS & UEDA, M. —
Quantification of lymphocyte subsets in AIDS associated with suspected
cytomegalovirus infection. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 285-290, 1990.

ABSTRACT: The present study investigates the number of immunoregulatory cells in 55 patients suspected of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) associated with cytomegalovirus (CMV) infection. Patients were divided into three groups: RISK (13 cases), LAS/ARC (21 cases) and AIDS (21 cases) according to epidemiological and clinical findings and using CDC criteria. The CMV infection was suggested based on clinical and serological evaluations. No significant difference in CMV seropositivity was observed among the groups (66.7% to 77.0%), although a diminished number of cases 3 (14.3%) with CMV-IgM antibody was detected in AIDS group. Phenotypic analysis of leukocytes, lymphocytes and lymphocyte subsets was realized. The results obtained were similar between CMV-seropositive and CMV-seronegative patients in each group studied. On the other hand, the number of T lymphocytes and T helper/inducer lymphocytes were markedly diminished in the LAS/ARC and AIDS groups. The number of T suppressor/ cytotoxic lymphocytes was increased in all groups analysed. These alterations in T lymphocyte subsets are responsible for the reversal ratio observed in these patients.

DESCRIPTORS: Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS); cytomegalovirus (CMV); human immunodeficiency virus (HIV); lymphadenopathy syndrome/AIDS-related complex (LAS/ARC); lymphocyte subsets; CMV-IgG-antibody; CMV-IgM-antibody.

INTRODUCTION

Infection by the HIV virus results in damaged of specific cells, notably the lymphocytes population which display surface CD4 marker as well as certain cells within the central nervous system²¹. Moreover, HIV can productively infect macrophages and monocytes, monocyte cell lines, CD8 + cell line and certain B-cell lines, but little or no cytopathic effect is noted in these cells types, probably because of the low concentration of T4 surface protein.

The cytopathic effect of the HIV are observed after membrane fusion in virus entry and syncytia formation. These events occur via interaction

of T4 epitope cell membrane and the HIV envelope glycoprotein (gp 120), that can be expressed on virus and infected cells²⁷.

These reactions lead to cell death by alteration of cell surface functions and loss of membrane integrity and swelling until disruption^{13,22}. Because of the tropism of the virus to the central immunoregulatory cell (T helper/inducer lymphocyte), all immunological functions are altered which predispose the appearance of opportunistic infections observed in AIDS^{15,19}. In immunosuppressed patients the cytomegalovirus (CMV) infections are frequent. The usual clinical and laboratorial manifestations observed in normal individuals are an infectious mononucleosis — like syndrome

* Realizado na Seção de imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

with the presence of atypical lymphocytosis in the peripheral blood and the absence of heterophil antibodies in the sera. The course of the disease is normally benign although the CMV remain latent during the life of the host. In cases of immunosuppression, especially in account of damage of cell-mediated immunity, the virus may reactivate. In AIDS patients the virus reactivation is related to a variety of clinical syndromes including chorioretinitis, esophagitis, colitis, pneumonia, encephalitis and adrenalitis⁷.

The present work has the aim of investigate the number of immunoregulatory cells in AIDS patients associated with CMV serological status.

PATIENTS AND METHODS

The study population consisted of 55 men aged 22 to 57 years (median 32) attended at Programme for AIDS Control and Prevention — Secretary of Health of São Paulo State with suspicion of AIDS associated with clinical CMV infection.

Patients were grouped as RISK, LAS/ARC and AIDS according to epidemiological and clinical features, using the definitions established by the Atlanta Center for Disease Control^{15,6}. The RISK group (13 asymptomatic male individuals) consisted of 3 heterosexual, 6 homosexual and 4 bisexual AIDS contacts, while the LAS/ARC group (21 cases) was composed of 19 homosexual and 2 bisexual men with persistent unexplained lymphadenopathy and others non specific clinical manifestations (fever, malaise, diarrhoea, weight loss). The AIDS group (21 cases) comprised 3 heterosexual, 13 homosexual and 5 bisexual men with opportunistic infections and/or Kaposi's sarcoma.

The clinical manifestations of CMV infection observed in these patients included chorioretinitis, esophagitis, pneumonia and infectious mononucleosis-like syndrome without heterophil antibodies.

Blood samples were collected and referred to the Instituto Adolfo Lutz for immunological evaluation.

Inactivated sera were tested for IgG and IgM specific antibodies to CMV by an indirect fluorescent antibody test (IgM-IFA to CMV, VIRGO Reagents, Electro-Nucleonics Inc., Maryland, USA), and by complement fixation test according to methodology previously described²⁰ using as antigen Herpes group reagent (BEHRING, Merburg, West Germany). In these assays, titers equal or higher than 8 were considered positive.

The number of leukocytes, monocytes and lymphocytes were determined in heparinized blood using hemocytometer counter and Leishman stain smear. Mononuclear cells were separated on Ficoll-Hypaque gradient³ and the number of T and B lymphocytes was obtained by means of the rosette method using sheep red blood cells and zymosan-complement complex¹.

Direct immunofluorescence technique previously described¹ was employed to determine the percentage of lymphocyte subsets using monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate from Becton-Dickinson Lab. USA. (Leu-3a for CD4 cell surface antigen — Helper/inducer T lymphocyte and Leu-2a for CD8 cell surface antigen — suppressor/cytotoxic T lymphocyte). The samples were analysed for immunofluorescence using a Zeiss epifluorescent microscope (Carl Zeiss Inc., West Germany) at 1000 x.

Statistical analysis of the data were performed according to Mann-Whitney, Kruskal-Wallis tests and complemented by Dunn multiple comparison test^{14,25}.

RESULTS

Of the 55 male patients in this study, 38 were homosexual, 11 bisexual and only 6 were heterosexuals. The patients' age ranged from 22 to 57 years with a medium of 32 years.

After collecting information about social and clinical data, the population was divided in three groups: RISK, LAS/ARC and AIDS.

TABLE 1

Number of CMV—positive sera detected by complement fixation (CF) and immunofluorescence (IF) tests from RISK, LAS/ARC and AIDS groups.

Group (n)	CF		IF		CF and IF		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
RISK (13)	3	(23.0)	3	(23.0)	4	(31.0)	10	(77.0)
LAS/ARC (21)	3	(14.3)	4	(19.1)	7	(33.3)	14	(66.7)
AIDS (21)	6	(28.6)	3	(14.3)	5	(23.8)	14	(66.7)

TABLE 2

Characterization of cells phenotypes from peripheral blood leukocytes in RISK, LAS/ARC, and AIDS groups according to serological CMV results.

Results are reported as medium values of the counts and the compared using Mann-Whitney analysis.

	RISK		LAS/ARC		AIDS	
	neg	pos	neg	pos	neg	pos
Leukocytes/mm ³	6900	6920	4920	5290	4460	4950
(n)	(3)	(10)	(7)	(14)	(7)	(14)
Lymphocytes/mm ³	2240	2530	1810	2080	1505	1813
(n)	(3)	(10)	(7)	(14)	(7)	(14)
Monocytes/mm ³	229	332	214	237	172	189
(n)	(3)	(10)	(7)	(14)	(7)	(14)
%T Lymphocytes	55	63	57	63	62	55
(n)	(3)	(10)	(7)	(14)	(6)	(14)
T Lymphocytes/mm ³	2271	1596	1034	1339	926	1025
(n)	(3)	(10)	(7)	(14)	(6)	(14)
%B Lymphocytes	14.5	17.0	16.0	14.0	18.0	16.0
(n)	(2)	(10)	(7)	(13)	(7)	(12)
B Lymphocytes/mm ³	352	396	281	288	234	303
(n)	(2)	(10)	(7)	(13)	(7)	(12)
CD4 + Cells	33	26	18	21	21	15
(n)	(3)	(7)	(3)	(10)	(5)	(9)
CD8 + Cells	25	36	42	41	38	40
(n)	(3)	(7)	(3)	(10)	(5)	(8)
CD4/CD8 ratio	1.43	0.89	0.43	0.54	0.72	0.58
(n)	(3)	(7)	(3)	(10)	(5)	(9)

TABLE 3

Comparison of the cells phenotypes results obtained from the three groups studied Results expressed as median values of the counts. P 0.05 as compared among the groups by Kruskal-Wallis analysis of variance and complemented by Dunn multiple comparisons test.*

	RISK X LAS/ARC		RISK X AIDS		LAS/ARC X AIDS	
Leukocytes/mm ³	6910	5170*	6910	4790*	5170	4790
Lymphocytes/mm ³	2470	1990	2470	1660	1990	1660
Monocytes/mm ³	308	229	308	183	229	183
%T lymphocytes	61	61	61	57	61	57
T Lymphocytes/mm ³	1752	1232	1752	996*	1237	996
%B Lymphocytes	16	15	15	17	15	17
B Lymphocytes/mm ³	389	286	389	278	286	278
CD4 + Cells	28	20	28	17*	20	17
CD8 + Cells	33	42	33	40	42	40
CD4/CD8 ratio	1.05	0.52	1.05	0.63*	0.52	0.63

CMV antibodies were present in 38 (69.1%) from 55 patients, and there is no significant difference when analysed statistically each group, separately (table 1).

Similar statistical results were observed when leukocytes, lymphocytes and monocytes were determined in CMV-seropositive and CMV-seronegative patients (table 2).

On the other hand, when compared cells

phenotype in peripheral blood of AIDS and LAS/ARC groups with the RISK one, it was possible to demonstrate difference among them (table 3).

DISCUSSION

Several reports described a severe impairment of cellular immunity response in AIDS associated with an imbalance between helper and suppressor T lymphocytes^{2,11,15,16,17,18,19}.

Others disease states have been associated with alteration in immunoregulatory system with reversal ratio of CD4/CD8 lymphocytes as shown in CMV-mononucleosis, Epstein-Barr virus mononucleosis, hepatitis B and autoimmune diseases^{4,9,23,24}. In such viruses during the acute phase of the disease occurs and elevation in the number of T suppressor/cytotoxic lymphocytes^{4,11,23}.

The CMV infection seen in AIDS patients is usually a reactivation of a childhood infection that was controlled, until HIV seriously destroyed the patients' immune system.

The ongoing presence of HIV overstimulates B lymphocytes that remains in a state of chronic activation²². The antibodies produced include some antibodies that combat current infections.

The activation of a great number of B lymphocytes diminishes the population of resting cells that are capable of produce antibodies in response to new pathogens. Consequently, the primary immune response is compromised leading to a low production of specific IgM antibodies²².

In this study it was possible to demonstrate antibodies to CMV in 66.7% to 77.0% of the patients, and no difference was observed among the RISK, LAS/ARC and AIDS groups. These results contrast with the data previously reported, where in male homosexual and patients with AIDS, the prevalence of CMV infections was around 90%^{7,9,17}.

When IgM antibody was analysed separately, a low number or seropositivity in AIDS patients was observed. Similar results have been confirmed by others investigators^{8,10}.

On the other hand, one reason of the reduced IgM antibodies detected in these patients was due a large quantities of inespecific antibodies presenting in the patients' sera, which mask the IgM determination. In order to avoid this pitfall, a sera adsorption using anti-IgG antibody affinity column could be used to improve the detection of IgM-CMV antibody²⁶.

Although the detection of CMV antibodies has not been employed for diagnosis of a current

infection, it provides a laboratory support to confirm a clinical suspicion of the disease.

The best criterion used to diagnose CMV infection requires the detection of the virus from the suspicious materials, employing culture methods or antigen detection techniques^{7,8,12,26}. The positivity of these methods not prove the specific clinical syndrome, since virus and antigenic particles may be eliminated from urine, blood and genital fluids during a long period after primary and recurrent infections.

Serological conversion is the diagnostic means in nonimmunocompromised patients, but in cases of AIDS this is not true, considering that they are seropositive for CMV before contract HIV infection⁸.

Despite the difficult, in this work was considered active infection due CMV, when taken together clinical manifestations and serological positive results.

These data showed the number of immunoregulatory cells in AIDS patients seropositive and seronegative for CMV. It was impossible establish a characteristic lymphocyte subsets imbalance for these associated diseases. The cellular status of these cases was the same that was observed on the others AIDS' cases associated with certain opportunistic infections^{2,19}.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Paulo Roberto Teixeira and his staff for access to patients under their care.

We thank Miss Cecília Kitamura for collect specimens and Mrs Mary E. Sakuma and Mrs Suely P. Curti for realize the complement fixation test.

The authors thank Dr Maria Lúzia Xavier from EMBRABIO — Empresa Brasileira de Biotecnologia for providing IgM-IFA to CMV kits.

We also thank Dr Neil Ferreira Novo and Dr Yara Juliano for statistical assistance.

CATERINO-de-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E. de los & UEDA, M. — Determinação de subpopulações linfocitárias na AIDS associada com provável infecção pelo Citomegalovírus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 285-290, 1990.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo determinar o número de células imuno-reguladoras em 55 casos suspeitos de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) associada com infecção citomegálica. Usando os critérios estabelecidos pelo CDC, os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com dados epidemiológicos e clínicos: RISCO (13 casos), LAS/ARC (síndrome da linfadenopatia / complexo relacionado à AIDS) (21 casos) e AIDS (21 casos). A infecção pelo Citomegalovírus foi sugerida com base nas avaliações clínicas e laboratoriais. Nenhuma diferença significativa foi observada na soropositividade para o CMV entre os grupos analisados (66,7% a 77,0%), apesar do grupo AIDS apresentar um pequeno número de casos 3 (14,3%) com anticorpo positivo para o CMV de classe IgM. A análise fenotípica dos linfócitos desses pacientes mostrou resultados semelhantes entre os grupos com sorologia positiva e negativa para o CMV. Por outro lado, o número de linfócitos T auxiliares/indutores mostraram-se marcadamente diminuídos nos grupos LAS/ARC e AIDS. O número de linfócitos T supressores/citotóxicos encontravam-se aumentados em todos os grupos analisados. Essas alterações nas subpopulações linfocitárias foram responsáveis pela inversão da relação linfócitos T auxiliares/linfócitos T supressores observada nesses pacientes.

DESCRITORES: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), Citomegalovírus (CMV), Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV), síndrome da linfadenopatia / complexo relacionado à AIDS (LAS/ARC), subpopulações de linfócitos, anticorpo para CMV de classe IgG, anticorpo para o CMV de classe IgM.

REFERENCES

1. ARAUJO, A.C. — Avaliação "in vitro" da resposta imune mediada por células na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida — AIDS, São Paulo, 1985. (Tese mestrado — Escola Paulista de Medicina) 136 p.
2. ARAUJO, A.C. — Cell-mediated immunity in the acquired immunodeficiency syndrome. *Brazilian J. med. biol. Res.*, 20: 579-582, 1987.
3. BOYUM, A. — Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 21 (suppl): 77-89, 1968.
4. CARNEY, W.P.; RUBIN, R.H.; HOFFMAN, R.A.; HANSEN, W.P.; HEALCY, K. & HIRSCH, M.S. — Analyses of T lymphocytes subsets in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Immunol.*, 126: 2114-2116, 1981.
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL — Update on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons — *United State. MMWR*, 31: 294, 300-301, 1982.
6. CENTER FOR DISEASE CONTROL — Update on acquired immunodeficiency syndrome - AIDS — *United States. MMWR*, 31: 507-508, 513-514, 1982.
7. DREW, W.L. — Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J. infect. Dis.*, 158: 449-456, 1988.
8. DREW, W.L. — Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev. infect. Dis.*, 10 (Suppl. 3): S468-S476, 1988.
9. DREW, W.L.; MINTZ, L.; MINER, R.C.; SANDS, M. & KETTERER, B. — Prevalence of cytomegalovirus infection in homosexual men. *J. infect. Dis.*, 143: 188-192, 1981.
10. DYLEWSKI, J.; CHOU, S. & MEUGAN, T.C. — Absence of the detectable IgM antibody during cytomegalovirus disease in patients with AIDS. *New Engl. J. Med.*, 309: 493, 1983.
11. FAHEY, J.L.; DETELS, R. & GOTTLIEB, M. — Immune-cell augmentation (with altered T-subset ratio) is common in healthy homosexual men. *New Engl. J. Med.*, 308: 842-843, 1983.
12. GRIFFITHS, P.D. — Chronic cytomegalovirus infection. *J. virol. Methods*, 21: 79-86, 1988.
13. HASELTINE, W. A. & SODROSKI, J.G. — Cell membrane fusion mediated by the envelope glycoproteins as the primary effector of AIDS virus cytopathicity. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, 138: 83-92, 1987.
14. HOLLANDER, M. & WOLFE, D. — *Nonparametric statistical methods*. New York, Wiley, 1973.
15. KALISH, R.S. & SCHLOSSMAN, S.F. — The T4 lymphocyte in AIDS. *New. Engl. J. Med.*, 313: 112-113, 1985.
16. KLATZMANN, D. & GLUCKMAN, J.C. — The pathophysiology of HIV infection: a complex pathway of host-virus interaction. *Ann. Inst. Pasteur/ Virol.*, 138: 21-29, 1987.
17. KORNFIELD, H.; STOUWE, R.A.V.; LANGE, M.; REDDY, M.M. & GRIECO, M.H. - T- lymphocyte subpopulations in homosexual men. *New. Engl. J. Med.*, 307: 729-731, 1982.
18. LANE, H.C.; DEPPER, J.M.; GREENE, W.C.; WHALEN, G.; WALDMANN, T.A. & FAUCI, A.S. — Qualitative analysis of immune function in pa-

- tients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *New. Engl. J. Med.*, 313: 78-84, 1985.
19. LANE, H.C. & FAUCI, A.S. — Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 477-500, 1985.
20. LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. — *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. 4th ed. New York, Am. Pub. Health, 1969. p. 52-58.
21. MICHAELS, J.; SHARER, L.R. & EPSTEIN, L.G. — Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection on the nervous system: a review. *Immunodef. Rev.*, 1: 71-104, 1988.
22. REDFIELD, R.R. & BURKE, D.S. — HIV infection: clinical picture. *Sci. Amer.*, 259: 90-98.
23. REINHERZ, E.L.; O'BRIEN, C.; ROSENTHAL, P. & SCHLOSSMAN, S.F. — The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 125: 1269-1274, 1980.
24. RINALDO, C.R.; CARNEY, W.P.; RICHTER, B.S.; BLACK, P.H. & HIRSCH, M.S. — Mechanisms of immunosuppression in cytomegaloviral mononucleosis. *J. Infect. Dis.*, 141: 488-495, 1980.
25. SIEGEL, S. — *Estatística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta*. México, Editorial Trillas, 1975. p. 346.
26. SMITH, T.F. & SHELLEY, C.D. — Detection of IgM antibody to cytomegalovirus and rapid diagnosis of the virus infection by the shell vial assay. *J. Virol. Methods*, 21: 87-96, 1988.
27. WEBER, N. & WEISS, R.A. — HIV infection: The cellular picture. *Sci. Amer.*, 256 100-109, 1988.

Recebido para publicação em 15 de março de 1990.

DETERMINAÇÃO DE CHUMBO E CÁDMIO EM ARTIGOS ESCOLARES*

Neusa Santesso GARRIDO**
Neus Pascuet PREGNOLATTO **
Lúcia Tiecco Fukushima MURATA **
Maria Rosa da SILVA**
Maria Cecília Depieri NUNES**
Virgínia Mendes ENGLER **
Alice Momoyo SAKUMA **

RIALA6/694

GARRIDO, N.S.; PREGNOLATTO, N.P. ; MURATA, L.T.F.; SILVA, M.R.; NUNES, M.C.D.; ENGLER, V.M. & SAKUMA, A.M. — Determinação de chumbo e cádmio em artigos escolares. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 291-296, 1990.

RESUMO: Foram analisadas, por espectrofotometria de absorção atômica com chama e eventualmente por polarografia, 205 amostras de artigos escolares compreendendo: borrachas para apagar, lápis pretos, canetas hidrográficas, tintas para colorir, massas para modelar, gizes de cera, "crayons" e colas coloridas, quanto à contaminação por chumbo e cádmio. Constatou-se que o metal presente em maior número de amostras é o chumbo. Sugere-se neste trabalho que seja elaborada, pelos órgãos competentes do Ministério da Saúde, uma norma específica para estes artigos.

DESCRITORES: chumbo e cádmio, material escolar, determinação; espectrofotometria de absorção atômica; polarografia.

INTRODUÇÃO

Chumbo e cádmio são metais pesados que constituem um sério risco à saúde, mesmo em pequenas quantidades, devido a seu acúmulo progressivo no organismo^{1,5}.

O chumbo, uma vez absorvido pelo organismo, é distribuído entre o sangue, os tecidos moles e o sistema esquelético, que constitui o compartimento de alta retenção, sendo a meia-vida biológica no osso humano ao redor de dez anos¹⁷. O cádmio, entretanto, concentra-se preferencialmente nos rins e no fígado, sendo que estes órgãos desempenham uma função importante no acúmulo do metal por períodos prolongados. A meia-vida biológica deste elemento em rins de humanos é acima de dez anos^{7,9}.

Uma atenção especial tem sido dada recente-

mente às crianças, em face do grande risco que provém da maior suscetibilidade destas aos metais pesados, devido à imaturidade de seu sistema nervoso central.⁸ Estudos comprovam que elas excretam, pela via renal, proporcionalmente quantidades menores de chumbo e cádmio que os adultos^{11,18}.

Por esta razão, é essencial que as crianças não sejam expostas a materiais contendo quantidades significativas destes metais.

Em muitos casos, como no do ambiente e no dos alimentos, é praticamente impossível evitar a contaminação por metais pesados, sendo, portanto, importante procurar eliminar outras fontes de contaminação de mais fácil controle, como nas embalagens para alimentos, nos objetos de uso infantil e nos artigos escolares.

Em 1983, GARRIDO e col.¹⁰ analisaram a

* Realizado na Seção de Plásticos, Vernizes e Outros Materiais de Embalagem e na Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

qualidade de chupetas, mordedores e outros artigos de uso infantil e verificaram que, pela ausência de uma norma para seu controle, uma grande porcentagem apresentava metais pesados em quantidades elevadas. Como consequência deste trabalho, foi instituída uma Comissão da Associação Brasileira de Normas Técnicas para a discussão deste assunto, que resultou, em 1988, na publicação de uma norma definitiva sob a denominação NBR 10.334 — Chupetas¹.

A comercialização de artigos escolares, principalmente borrachas fabricadas com policloreto de vinila, com aromas e formatos de alimentos, incentivando a criança a colocá-los na boca, fez com que surgisse o interesse em analisar esses artigos, dando prosseguimento ao trabalho já desenvolvido¹⁰. A verificação dos níveis de chumbo e cádmio nesses produtos se justifica, uma vez que os corantes e pigmentos à base de sais de chumbo e cádmio são muito usados devido a seu alto grau de recobrimento, estabilidade à luz e a altas temperaturas e a seu baixo custo¹².

Neste caso, não existe também uma legislação que regulamente o uso desses produtos, nem do ponto de vista analítico nem tampouco quanto aos limites máximos permitidos desses metais pesados.

Em 1987 foi aprovada pela Associação Brasileira dos Fabricantes de Brinquedos — ABRINQ uma Norma Brasileira Voluntária de Segurança para Fabricação de Brinquedos²; entretanto, esta norma não tem valor legal e os limites permitidos por ela para metais pesados, do ponto de vista toxicológico, são muito elevados, uma vez que nem sempre a criança utiliza um artigo escolar de maneira correta. Ela pode pintar sua pele com a tinta das canetas, ingerir partes de lápis, massa de modelar e giz de cera. Isto é uma fonte potencial de contaminação que pode ser evitada pelo controle destes materiais, não somente quanto aos metais pesados presentes, mas também quanto à migração de componentes orgânicos destes artigos.

O objetivo deste trabalho é fazer um levantamento dos níveis de chumbo e cádmio em artigos escolares utilizados normalmente por crianças e sugerir que sejam normatizados tanto os produtos quanto as matérias-primas utilizadas para sua elaboração.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras analisadas foram as adquiridas no comércio da cidade de São Paulo e as enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise, perfazendo um total de 205 amostras, das 29 marcas distintas

disponíveis no mercado, assim discriminadas:

borrachas para apagar.....	37
lápís pretos.....	04
canetas hidrográficas.....	39
tintas para colorir.....	17
massas para modelar.....	38
gizes de cera.....	36
"crayons".....	23
colas coloridas.....	11

Para efeito de análise, foram consideradas separadamente as diversas cores de um mesmo produto como amostras diferentes. No caso das borrachas para apagar, massas para modelar, gizes de cera e "crayons", as amostras foram previamente reduzidas a fragmentos pequenos e homogeneizadas; para os lápis, foi considerado apenas o verniz externo e para as canetas hidrográficas, somente a carga.

Aparelhagem

Espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin-Elmer, mod. 460); lâmpadas EDL de chumbo e de cádmio e corretor de deutério.

Polarógrafo (Metrohm, mod. Polarecord 626) acoplado ao Stand mod. VA 663, com eletrodo de gota pendente de mercúrio, eletrodo de prata/cloro de prata e eletrodo de platina.

As condições polarográficas foram:

Potencial inicial	: -0,80 V
Potencial final	: -0,20 V
Sensibilidade	: 1 ou 2 nA/mm
Amplitude de pulso	: 50 mV
Tempo de pré-eletrólise	: 2 minutos
Tempo de espera	: 30 segundos
Velocidade de varredura	: 5 mV/s
Velocidade do papel	: 100 mV/cm
Potencial de pico para o cádmio	: -0,60 V
Potencial de pico para o chumbo	: -0,40 V

Reagentes

Cádmio metálico (99,9% de pureza)
Nitrato de chumbo p.a.
Solução de pirrolidinaditiocarbamato de amônio a 2 %
Metil isobutil cetona
Ácido clorídrico (com baixo teor de metais pesados)
Solução de ácido clorídrico 0,1 M
Solução de ácido clorídrico 2,5 M
Solução de ácido nítrico a 1%
Solução de ácido cítrico a 10%
Solução alcoólica de verde de bromocresol a 0,1 %
Solução de amônia a 50 %

Solução-padrão de cádmio

Solução estoque, 1.000 mg/l — Dissolver 1,000 g de cádmio metálico em volume mínimo de ácido clorídrico concentrado em balão volumétrico de 1 litro. Diluir até esse volume com solução de ácido clorídrico a 1 %.

Solução-padrão de chumbo

Solução estoque, 1.000 mg /l — Dissolver 1,598 g de nitrato de chumbo em solução de ácido nítrico a 1 % em balão volumétrico de 1 litro e completar o volume com a mesma solução.

Procedimento

Foram pesados, com exatidão, cerca de 10 g de amostra e submetidos inicialmente à destruição da matéria orgânica por via seca, como descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁴. O resíduo foi dissolvido com solução de ácido clorídrico 0,1 M e transferido para um balão volumétrico de 25 ml, sendo o volume completado com a mesma solução.

Foi transferida uma alíquota de 10 ml para um balão volumétrico de 50 ml e adicionados 5 ml de ácido cítrico a 10%, duas gotas de solução alcoólica de verde de bromocresol a 0,1 % e solução de amônia a 50 % até viragem do indicador, de amarelo para azul e obtenção de um pH final 5,4.

Os metais foram complexados com 2 ml de pirrolidinaditiocarbamato de amônio a 2 %, com posterior agitação durante um minuto e extraídos com 2 ml de metil isobutil cetona, com agitação por um minuto.

Foi adicionada água destilada até que a fase orgânica ficasse na parte estreita do balão.

As determinações de chumbo e cádmio foram efetuadas por espectrofotometria de absorção atômica com chama. Os padrões de trabalho e os brancos foram preparados de modo semelhante. As leituras foram efetuadas na fase orgânica e o aparelho zerado com solução de metil isobutil cetona saturada com água.

Considerando-se que o limite de detecção para chumbo e cádmio do método utilizado é, respectivamente, de 0,1 e 0,01 mg/kg, quando a concentração destes elementos na amostra estava abaixo destes limites, as determinações foram efetuadas por polarografia inversa ("stripping"), cujo limite de detecção para ambos os metais é de 0,01 mg/kg.

Foram então repesados, com exatidão, cerca

de 10 g da amostra. Após a destruição por via seca, o resíduo foi dissolvido em 5 ml de solução de ácido clorídrico 2,5 M e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25 ml, sendo o volume completado com água destilada e desmineralizada. Uma alíquota de 10 ml foi transferida para a cela polarográfica. A solução foi desaerizada borbulhando nitrogênio durante dois minutos.

A determinação das concentrações dos metais foi calculada pelo método de adição de padrão.

RESULTADOS

Os valores mínimo e máximo de chumbo e cádmio encontrados nas amostras analisadas estão expressos na tabela.

As figuras 1 e 2 mostram a relação da porcentagem de amostras distribuídas em 4 faixas de concentração estipuladas: de 0 a 5; de 5 a 10; de 10 a 20; e acima de 20 mg/kg, respectivamente para chumbo e cádmio.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, pode-se verificar que níveis significativos de chumbo e cádmio foram evidenciados em algumas amostras, sendo que o chumbo é o contaminante presente em maior concentração, quando comparado com o cádmio.

Uma amostra de giz de cera apresentou nível de chumbo muito elevado (5.000 mg/kg), o que sugere que o pigmento utilizado era à base de sais de chumbo.

Com relação aos níveis de cádmio, apenas as borrachas para apagar apresentaram contaminação por este elemento.

Considerando que os artigos analisados são usados principalmente por crianças de dois a dez anos, faixa etária em que possuem o hábito de colocar na boca objetos não comestíveis¹⁵, foi tomada por base a legislação brasileira onde o limite de chumbo⁶ em alimentos varia de 0,05 a 2,00 mg/kg e o de cádmio⁴ de 0,20 a 1,00 mg/kg.

Adotando o limite superior de cada faixa, verificou-se que 45% das amostras analisadas apresentaram teor de chumbo e 9% teor de cádmio acima destes limites.

No caso específico de massas para modelar, a legislação australiana¹⁶ estabelece um limite de 1,5 mg de chumbo e 0,005 mg de cádmio por quilograma do material. Tomando por base esses

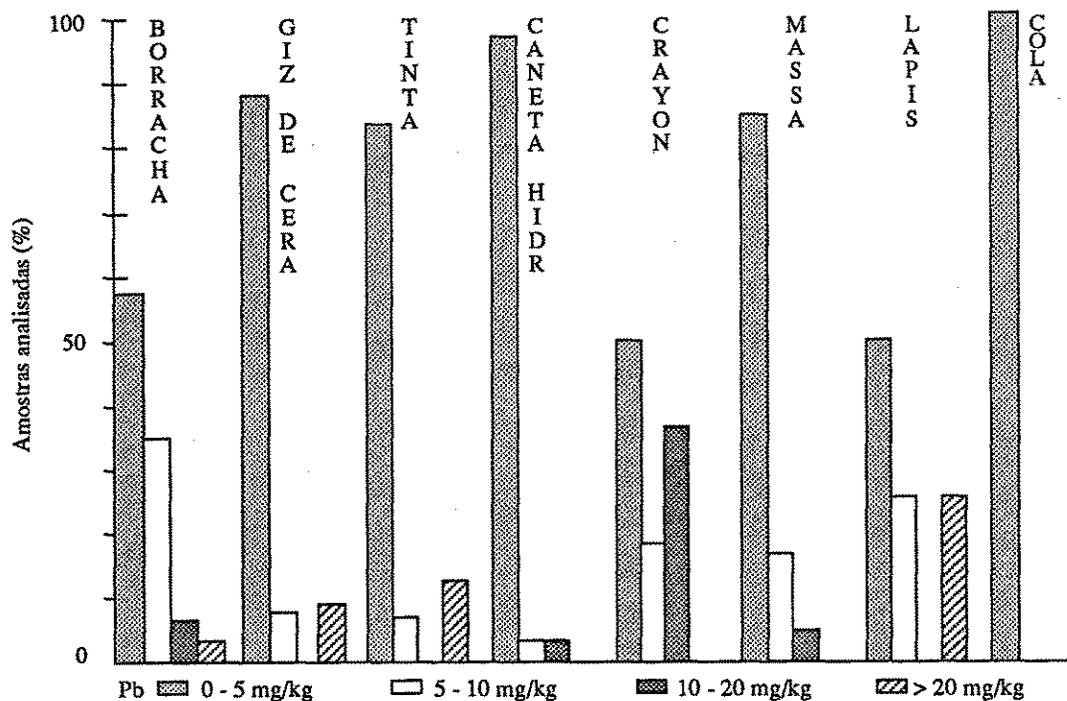


Figura 1 - Distribuição dos níveis de chumbo nas amostras analisadas.

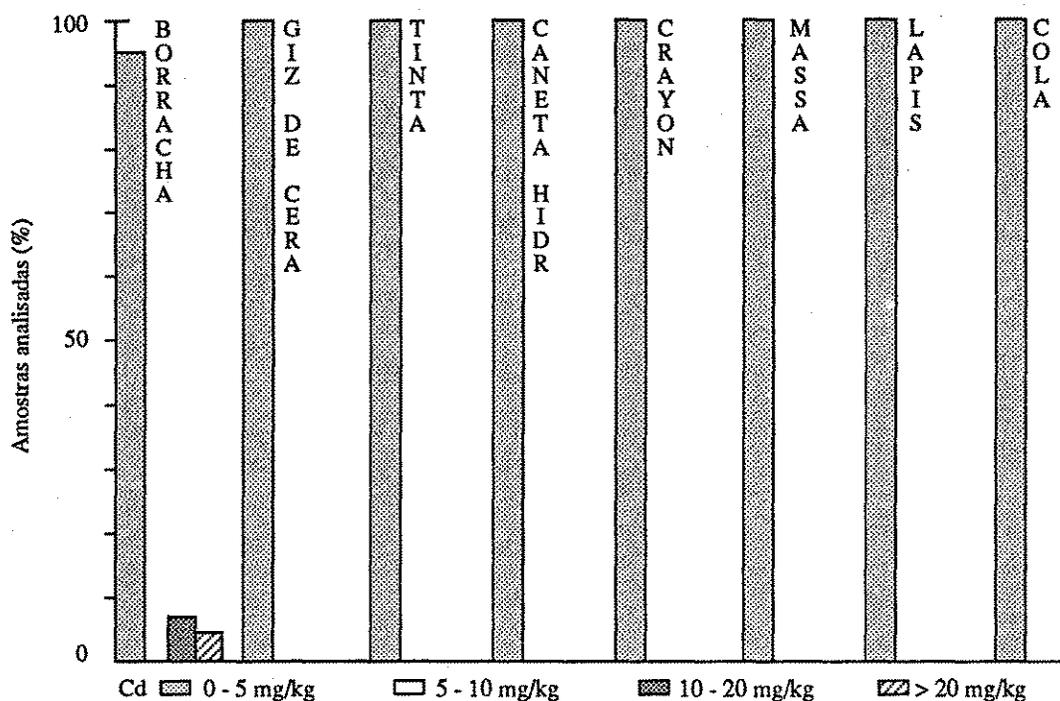


Figura 2 - Distribuição dos níveis de cádmio nas amostras analisadas.

TABELA
Níveis de chumbo e cádmio em artigos escolares

Tipo de material	Nº amostras analisadas	Chumbo (mg/kg)		Cádmio (mg/Kg)	
		Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor Mínimo	Valor Máximo
Borracha	37	0.06	249	0.01	43
Giz de cera	36	0.10	5000	0.02	0.99
Tinta	17	0.07	46	0.01	0.33
Caneta Hidrográfica	39	0.08	13	0.06	1.60
"Crayon"	23	1.88	14	0.09	1.25
Massa de Modelar	38	0.50	12	0.02	0.83
Lápis	4	0.08	25	0.10	3.04
Cola Colorida	11	0.09	1.40	0.02	0.11

limites, verificou-se que 79% das amostras analisadas continham chumbo e 82% continham cádmio acima destes valores.

Enfatiza-se que neste trabalho foram considerados apenas os teores de chumbo e cádmio na verificação da qualidade destes materiais, sendo que estão presentes em suas formulações outros componentes que também podem ocasionar riscos às crianças, como os plastificantes e aceleradores de vulcanização utilizados como componentes de plásticos e borrachas, respectivamente, e os solventes das tintas, colas e canetas hidrográficas e que devem, portanto, ser controlados.

Pelo exposto, torna-se necessária a elaboração de dispositivos legais que regulamentem e

controlem estes artigos.

Recomenda-se que esta norma forneça uma lista positiva de matérias-primas para o fabrico destes artigos, limites de migração de componentes que apresentem toxicidade, métodos gerais e específicos para seu controle, como previsto na legislação de embalagens para alimentos⁵ e também inclua dispositivos restritivos quanto à utilização de aromas de alimentos em suas formulações, como consta na Lei Belga³ e na Australiana¹⁶.

Baseado neste estudo preliminar, sugere-se que seja feito um controle, através da fiscalização, verificando-se inclusive a qualidade de outros tipos de materiais escolares que não foram examinados.

GARRIDO, N.S.; PREGNOLATTO, N.P.; MURATA, L.T.F.; SILVA, M.R.; NUNES, M.C.D.; ENGLER, V.M. & SAKUMA, A.M. — School materials: determination of lead and cadmium. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 291-296, 1990.

ABSTRACT: 205 samples of school materials including: erasers, black pencils, hydrographic pens, printing-inks, modeling materials, wax crayons, crayons and coloured glues, were analyzed in order to determine their lead and cadmium contents by flame atomic absorption spectrophotometry and polarography. It is also suggested that the qualified official agency issue a norm related to this matter.

DESCRIPTORS: lead and cadmium, school materials, determination; flame atomic absorption spectrophotometry; polarography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Chupetas* - Rio de Janeiro, ABNT, 1988. (Especificação; NBR-10.334.)
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS FABRICANTES DE BRINQUEDOS. *Norma brasileira voluntária de segurança para fabricação de brinquedos*. São Paulo, ABRINQ, 1987.
3. BÉLGICA. Leis, decretos etc. — *Arrêté royal relatif à la mise dans le commerce de jouets et d'objets usuels pour enfants*, 7 Aout. 1984. Bélgica, Moniteur Belge, 8.11.1984. p. 14611.
4. BRASIL. Leis, decretos etc. — Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. *Diário Oficial*, Brasília, 9 abr. 1965. Seção I, pt I, p. 3610-22. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962.
5. BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução 45/77, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1 fev. 1978. Seção I, pt I, p. 1781-95. Aprova as listas de polímeros, resinas e respectivos aditivos e regulamentação seu emprego na elaboração ou revestimento de embalagens.
6. BRASIL. Leis, decretos etc. — Portaria nº 16 de 13 de março de 1990, do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 15 mar. 1990. Seção I, pt. I, p. 5436. Estabelece os limites máximos de tolerância de chumbo (Pb) em alimentos.
7. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *Criteria (dose/effect relationships) for cadmium*. Report of a Working Group of Experts. Oxford, Pergamon Press, 1978. p. 15-120.
8. EATON, D.F. et alii. — Chromium and lead in colored printing inks used for children's magazines. *Environ. Sci. Technol.*, 9: 768-70, 1975.
9. FRIBERG, L. et alii — *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam, Elsevier, 1979.
10. GARRIDO, N.S.; PREGNOLATTO, N.P. & MURATA, L.T.F. — Análise de qualidade e sugestão de norma para análise de chupetas, mordedores e outros artigos de uso infantil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43: 41-6, 1983.
11. KOSTIAL, K. et alii — The influence of age on metabolism and toxicity. *Environ. Health Perspect.*, 25: 81-6, 1978.
12. MILES, D.C. & BRISTON, J.H. — *Tecnologia dos polímeros*. São Paulo, EDUSP/Polígono, 1975. p. 365.
13. PIOTROWSKI, I.K. & COLEMAN, J.K. — *Environmental hazards of heavy metals: summary evaluation of lead, cadmium and mercury*. London, MARC/GEMS, 1980. p. 1-18. (MARC report n.20).
14. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed., São Paulo, 1985. v. 1, p. 430-435.
15. SAX, N.I. — *Handbook of dangerous materials*. New York, Reinhold, 1951. p. 70, 217-220.
16. STANDARDS ASSOCIATION OF AUSTRALIA. *Children's toys (safety requirements) part 3. Toxicological requirements*: AS 1647. North Sydney, N.S.W., 1982.
17. ZENEON, O. — *Migração de chumbo e cádmio de recipientes cerâmicos. Estudo visando a sua regulamentação bromatológica*. São Paulo, 1986. [Dissertação (mestrado) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP].
18. ZIEGLER, E.E. et alii — Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr. Res.*, 12: 29-34, 1978.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.

ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS ENVOLVIDOS COM O ENSAIO DA DNA POLIMERASE DO VÍRUS DA HEPATITE B (*)

Yuriko MIYAMOTO**
João Renato Rebello PINHO***

RIALA6/695

MIYAMOTO, Y. & PINHO, J.R.R. — Análise de alguns parâmetros envolvidos com o ensaio de DNA polimerase do vírus da hepatite B. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 297-299, 1990.

RESUMO: O micrométodo para detecção da atividade da DNA polimerase do vírus da hepatite B descrito por LIN et alii² foi modificado, e realizou-se um estudo comparativo entre as duas técnicas. Além disso, foram comparados dois tipos diferentes de papel de filtro, o GF/C e o AP20. Todos os testes apresentaram resultados viáveis; ademais, pudemos verificar que a técnica de Lin modificada e o filtro AP20 mostraram maiores diferenciais, sendo recomendados para este tipo de trabalho.

DESCRITORES: DNA polimerase; vírus da hepatite B; hibridização molecular; papel de filtro com fibra de vidro.

INTRODUÇÃO

A atividade da DNA polimerase (DNAP) do vírus da hepatite B (HBV) no soro é um dos marcadores que permitem detectar a replicação viral, através da monitoração da incorporação de nucleotídeos radioativos no genoma viral. Inicialmente, o método foi descrito por KAPLAN et alii¹, que utilizavam uma etapa de ultracentrifugação no preparo das amostras. Em 1984, LIN et alii² desenvolveram um micrométodo dispensando essa etapa, e utilizando ácido fosfonofórmico (PFA) como inibidor da DNAP viral.

Em nosso laboratório, utilizamos a técnica de Lin, porém com algumas modificações, e desenvolvemos uma análise comparativa entre o nosso método e o originalmente proposto pelo autor.

Além disso, realizamos um estudo com dois tipos diferentes de papéis de filtro com fibra de vidro, o GF/C, normalmente utilizado em nossas reações, e o AP20, para teste.

Algumas das amostras haviam sido anteriormente analisadas por hibridização molecular (HBV-DNA), conforme PINHO et alii³, e também por DNAP.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo das duas técnicas, utilizamos oito soros anteriormente testados por HBV-DNA, dos quais seis haviam também sido analisados por DNAP, sendo um soro positivo e um negativo para essas duas técnicas, três soros com resultados discordantes (um positivo para HBV-DNA e negativo para DNAP, e dois positivos para DNAP, mas negativos para HBV-DNA), um soro duvidoso com a hibridização e negativo para DNAP, e, finalmente, um positivo e um negativo testados apenas para HBV-DNA (Tabela 2).

Os soros foram incubados a 37°C por 16 horas, em solução de reagentes, de acordo com a tabela 1.

* Realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz.

** Instituto de Medicina Social e de Criminologia do Estado de São Paulo.

*** Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz.

Cada amostra foi incubada em duplicata, um tubo contendo PFA e outro sem PFA. Em seguida, foram adicionados 25µl de Pronase E, para parar a reação, incubando-se 40°C por uma hora.

As amostras foram então transferidas para papéis de filtro GF/C, recortados em círculos de 25 mm de diâmetro e secos em estufa a 70°C. A seguir, os filtros foram lavados cinco vezes em TCA 5% + Pirofosfato de Sódio 50 mM por dez minutos e uma vez em etanol por quinze minutos, sob agitação. Foram novamente secos a 70°C, e colocados em 8 ml de líquido de cintilação, para contagem da radioatividade por um minuto, em contador beta. O soro é considerado positivo se apresentar uma diferença significativa entre os dois tubos.

O intervalo entre a dosagem prévia de DNAP e este ensaio foi de cerca de seis meses.

Para a comparação dos dois tipos de filtros, foram utilizados um soro positivo e outro negativo, e papéis de filtro com fibra de vidro GF/C (Whatman) e AP20 (Millipore), analisados pelo método de Lin modificado.

RESULTADOS

Em todas as amostras, obtivemos resultados concordantes nas duas técnicas de DNAP, e também com a DNAP anterior. Das duas amostras que haviam sido testadas anteriormente somente por hibridização, uma foi igualmente negativa para DNAP, e a outra discordante (negativa para DNAP, e positiva para HBV-DNA), como mostra a tabela 2.

Os dois tipos de papéis de filtro apresentaram os resultados esperados, de acordo com a tabela 3.

TABELA 1

Solução de Reagentes

REAGENTES	MÉTODO DE LIN	
	Modificado	Original
Tris HCl pH 7,6	-	77mM
Tris HCl pH 7,4	100mM	-
KCl	154mM	400mM
MgCl ₂	38mM	-
Mg (CH ₃ COO) ₂	-	2,5mM
NH ₄ Cl	57mM	-
2-Mercaptoetanol	0,14%	0,1%
Nonidet P-40	0,89%	1,0%
dNTPs (A+C+G) cada	0,1mM	0,3mM
³ H-TTP	1,5µCi	2,0µCi
PFA	2,5mM	1,0mM
Soro	50ul	25ul
Solução de reagentes	25ul	50ul

TABELA 2

Resultados dos Testes de DNAP e HBV-DNA

Soro	DNAP			HBV-DNA	
	1	2	3	1	2
1	+(532)	+(286)	+(346)	-	+++
2	N.R.	-(22)	-(28)	++	++
3	-(<0)	-(21)	-(36)	+/	-
4	-(<0)	-(48)	-(19)	+	-
5	+(846)	+(862)	+(399)	-	++++
6	N.R.	-(<0)	-(<0)	-	N.R.
7	+(646)	+(564)	+(285)	+++	N.R.
8	- (7)	- (2)	- (<0)	-	-

DNAP: 1- DNAP prévia; 2- Método de Lin modificado; 3- Método de Lin original. Os números entre parênteses indicam o diferencial: até 100 = negativo; de 100 a 200 = incorporação baixa; de 200 a 300 = incorporação moderada; acima de 300 = incorporação elevada.

HBV-DNA: 1- Hibridização anterior; 2- hibridização realizada posteriormente. O número de cruzes indica semi-quantificação da positividade (+ a ++++).

N.R.: Não realizado

TABELA 3

Comparação dos Papéis de Filtro

Soro	GF/C	AP20
+	+(4210)	+(5585)
-	- (<0)	- (14)

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que tanto a técnica de Lin modificada como a original são viáveis, embora a DNAP prévia talvez apresente maior sensibilidade, como se nota pelos diferenciais obtidos (Tabela 1).

A discordância entre a amostra positiva para HBV-DNA e negativa para DNAP deve-se talvez à maior sensibilidade da técnica. Quanto às duas amostras negativas para hibridização, e que foram positivas para DNAP, um novo teste de HBV-DNA foi realizado, cujo resultado comprovou a positividade de ambos. A amostra duvidosa e a positiva(+) para HBV-DNA, que era negativa para DNAP, numa segunda hibridização, foi também negativa (Tabela 2).

Pudemos observar também que, após seis meses de armazenamento a -20°C, os resultados obtidos por DNAP foram praticamente os mesmos.

No teste dos dois papéis de filtro, ambos apresentaram os resultados esperados, sendo que

o filtro AP20 mostrou um diferencial maior que o GF/C.

Nossos resultados demonstram também a utilidade da realização das duas técnicas, a DNAp e o

HBV-DNA, para a monitoração da replicação do HBV, pois a detecção da atividade da DNA polimerase funciona como um eficiente controle de qualidade da técnica de hibridização, ao menos durante a padronização desta.

RIALA6/669

MIYAMOTO, Y. & PINHO, J.R.R. — Some parameters for the assay of the DNA polymerase of the hepatitis B virus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 50 (1/2): 297-299, 1990.

ABSTRACT: The micromethod for detection of the hepatitis B virus DNA polymerase activity described by LIN et alii was modified, and a comparative study between this two techniques was performed. Besides, two different kinds of filter paper utilized in the reaction, the GF/C and the AP20, were compared. All the tests showed viable results, although the modified Lin's technique and the filter AP20 showed larger differentials.

DESCRIPTORS: DNA polymerase; hepatitis B virus; molecular hybridization;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAPLAN, P.M.; GREENMAN, R.L.; GERIN, J.L.; PURCELL, R.H. & ROBINSON, W.S. — DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.*, 12: 995-1005, 1973.
2. LIN, H.J.; WU, P.C.; LAI, C.L. & CHAK, W. — Micromethod for phosphonoformic inhibition assay of hepatitis B viral DNA polymerase. *Clin. Chem.*, 30: 549-552, 1984.
3. PINHO, J.R.R.; FONSECA, L.E.P.; SONG Y.; MIYAMOTO, Y.; CARRILHO, F.J.; GRANATO, C.F.H. & SILVA, L.C. — Comparison of serum hepatitis B virus replication markers in chronic patients: studies on HBeAg/Anti-HBe system, viral DNA polymerase and HBV-DNA. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 31: 328-335, 1989.

Recebido para publicação em 23 de março de 1990

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE SUJIDADES LEVES EM SOPAS DESIDRATADAS*

Claydes de Quadros ZAMBONI**
Helena Ide ALVES**
Márcia Bittar ATUI**

RIALA6/696

ZAMBONI, C. Q.; ALVES, H. I.; ATUI, M. B. — *Métodos para detecção de sujidades leves em sopas desidratadas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 301-305, 1990.

RESUMO: Foram analisadas 56 amostras de sopas desidratadas de Merenda Escolar, de dezembro de 1988 a setembro de 1989, enviadas pelas Prefeituras Municipais do Estado de São Paulo ou pelas indústrias alimentícias, com finalidade de se verificar a sanidade desses produtos, o que motivou o desenvolvimento e adaptação de métodos às condições de trabalho do laboratório. Das 56 amostras, 18 eram constituídas somente por ingredientes moídos e 38 continham macarrão além dos ingredientes básicos. Para a separação dos ingredientes das sopas foi idealizado e desenvolvido um método (na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto "Adolfo Lutz") e para a determinação de sujidades leves foram utilizados os métodos descritos no Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists e no Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Os resultados mostraram que das 38 amostras que continham macarrão, 18 (47,37%) estavam em condições higiênicas insatisfatórias devido ao macarrão e 11 (28,95%) foram condenadas devido aos ingredientes moídos. Das 18 amostras contendo somente ingredientes básicos, oito (44,44%) estavam em desacordo com a legislação. As condenações foram ocasionadas pela presença de fragmentos de insetos acima do limite tolerado, presença de larvas, pêlos de roedor e ácaros. Das 56 amostras analisadas, nove continham proteína texturizada de soja, cuja análise demonstrou estar em boas condições de higiene. Conclui-se que os métodos aplicados deram bons resultados e que o macarrão contribuiu para a condenação das sopas desidratadas que continham esse ingrediente, principalmente com relação ao número de fragmentos de insetos.

DESCRITORES: sopas desidratadas; sujidades leves em análise microscópica.

INTRODUÇÃO

Sopa desidratada é o produto obtido pela mistura de ingredientes tais como cereais e vegetais desidratados, farinhas de cereais e de leguminosas, leite em pó, condimentos, massas alimentícias, proteína texturizada de soja, extrato de carne e outros e devem ser preparadas com substâncias limpas e sãs^{8,15}.

O consumo de sopas desidratadas aumentou consideravelmente nos últimos anos devido à utilização desse tipo de produto pela Fundação de Assistência ao Estudante (FAE), pois, sendo um produto formulado, favorece a obtenção de um alimento balanceado para ser oferecido aos esco-

lares; além disso, é fácil de ser preparado pelas merendeiras.

A verificação das condições higiênicas desse tipo de produto é de grande importância, pois a finalidade da distribuição da merenda é atingir a população escolar carente; desse modo, os alimentos devem estar hígidos, pois vão ser consumidos por indivíduos em condições de subnutrição e, acreditamos, mais susceptíveis a doenças.

Os métodos descritos para a detecção de sujidades leves (insetos, fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedor) são específicos para determinados tipos de produtos como farinhas de

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. Apresentado no 5º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos em Salvador, BA, 1989.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

cereais e de leguminosas, massas alimentícias, condimentos, proteína texturizada de soja^{1,2,4,5} não tendo sido descrito um método para sopa desidratada, produto composto de vários ingredientes.

Foi constatado em pesquisas anteriores, que as matérias-primas ingredientes das sopas, como macarrão e farinhas de cereais, principalmente, apresentavam-se em condições higiênicas insatisfatórias ou impróprias para o consumo^{17,18}, o que nos levou a idealizar este trabalho, tendo como objetivos a verificação da presença de sujidades leves em sopas desidratadas, através do desenvolvimento de métodos adaptados a esse tipo de produto, baseado em técnicas descritas para os diversos componentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 56 amostras de sopas desidratadas de Merenda Escolar enviadas pelas Prefeituras Municipais do Estado de São Paulo ou pelas indústrias alimentícias produtoras, de dezembro de 1988 a setembro de 1989.

Antes da pesquisa de sujidades foi feito um tratamento prévio para a separação dos componentes da sopa, cuja técnica foi desenvolvida na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz. Para a pesquisa de sujidades leves foram empregados três métodos de extração aplicados ao macarrão, ingredientes moídos (farinha de milho, farinha de ervilha, farinha de feijão e outras) e proteína texturizada de soja, separadamente, descritos no Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists^{3,4,5} e no Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists¹.

Procedimento — Pesar aproximadamente 400 g de sopa.

Esta tomada de ensaio vai depender da quantidade de macarrão, dos ingredientes moídos e da soja contidos na sopa; para a determinação de sujidades são necessários 100g de macarrão, 100g dos ingredientes moídos e 50g de proteína texturizada de soja. Desidratar com álcool etílico e desengordurar com éter etílico misturados na proporção de 1:1 (v/v). Filtrar a vácuo sobre papéis de filtro e transferir os papéis para uma bandeja de alumínio espalhando o material. Tamisar a amostra desengordurada, passando pelos tamises nº 10 para separar a proteína texturizada de soja dos vegetais desidratados e do macarrão; e nº 20 e 30 para separar os ingredientes moídos (farinhas e condimentos) da soja. Lavar a soja que ficou retida no tamis, para retirar o restante dos ingredientes moídos; transferir para uma bandeja e secar em estufa 100°C.

Após a tamisação das sopas que não contiverem condimentos, pesar 100g dos ingredientes moídos e proceder à análise de sujidades leves pelo método da digestão com pancreatina (peneira) segundo o Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists³.

Nas sopas em que os ingredientes moídos são constituídos por farinhas e contiverem condimentos bastante triturados (salsa), é necessário separar os condimentos e desprezá-los, a fim de que estes não atrapalhem a extração. Passar por tamis de nº maior que 30; pesar 100g do material que passou pelo tamis e proceder à análise de sujidades leves pelo método da digestão com pancreatina segundo o Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists⁴, utilizando como líquido extrator álcool a 80° e não a 60° como descrito na técnica.

Pesar 50g da proteína texturizada de soja lavada e proceder à análise de sujidades leves aplicada em farinha de soja segundo o Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists³.

No tamis nº 10 ficam retidos macarrão e vegetais desidratados que devem ser separados. Colocar o macarrão num bquer e lavar com água; como os vegetais desidratados são mais leves que o macarrão, eles flutuam e o macarrão sedimenta; decantar o sobrenadante e repetir esta operação até a retirada total dos vegetais, que serão desprezados.

Filtrar o macarrão que ficou no bquer, a vácuo, sobre papel de filtro e transferir para uma bandeja de alumínio. Espalhar o material e deixar secar em estufa (100°C); se ainda houver resíduo de vegetais, proceder á catação manual.

Pesar 100g do macarrão já seco e analisar pelo método da digestão ácida, segundo o Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists (A. O. A. C.)⁵ e Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (A. A. C. C.)¹.

RESULTADOS

Os resultados estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

Os métodos utilizados foram adequados para a determinação de sujidades leves tanto no macarrão como nos ingredientes moídos (farinha) e na proteína texturizada de soja.

TABELA 1

Sujidades em sopas desidratadas contendo macarrão

Sujidades \ Amostras		Componentes das sopas analisadas			
		Ingredientes moídos		Macarrão	
		nº	%	nº	%
Fragmentos de insetos	0 a 30	34	89,50	24	63,13
	+ de 30	4	10,50	14	36,27
TOTAL		38	100,00	38	100,00
Pêlos de roedor	0	34	89,50	34	89,50
	+ de 1	4	10,50	4	10,50
TOTAL		38	100,00	38	100,00
Insetos mortos	0	34	89,50	38	100,00
	+ de 1	4	10,50	0	0,00
TOTAL		38	100,00	38	100,00
Larvas de insetos mortas	0	37	97,30	38	100,00
	+ de 1	1	2,70	0	0,00
TOTAL		38	100,00	38	100,00
Ácaros mortos	0	37	97,30	38	100,00
	+ de 1	1	2,70	0	0,00
TOTAL		38	100,00	38	100,00

TABELA 2

Sujidades em sopas desidratadas que não continham macarrão

Sujidades \ Amostras		nº	%
Fragmentos de insetos	0 a 30	14	77,80
	+ de 30	4	22,20
Total		18	100,00
Insetos mortos	0	14	77,80
	+ de 1	4	22,20
Total		18	100,00
Larvas de insetos mortas	0	18	100,00
	+ de 1	0	0,00
Total		18	100,00
Ácaros mortos	0	18	100,00
	+ de 1	0	0,00
Total		18	100,00

Em algumas amostras houve dificuldade na separação dos componentes. Como existem sopas em que os ingredientes moídos contém condimentos bastante triturados, é necessário separá-los, a fim de que estes não interfiram durante a extração das sujidades. A separação é feita por tamisação dos ingredientes pulverizados, utilizando-se tamises com malhas de números superiores a 30, de modo que os ingredientes moídos passem e fiquem retidos somente os condimentos (salsa, etc.), o que foi conseguido por tentativas. Houve casos em que a tamisação não foi eficiente. Foi, então, idealizado um teste, utilizando três amostras de farinha de trigo em que foram adicionadas quantidades conhecidas e iguais de salsa. Às três amostras assim preparadas foram aplicados os métodos: Tween 80 - Versene,^{2,16} método da peneira⁴ utilizando álcool a 60° e método da peneira em que o álcool a 60° foi substituído por álcool a 80°. Dos três métodos o que recuperou menos salsa foi o do Tween 80 — Versene; porém, sobrou muita farinha no líquido extrator. O método da peneira utilizando álcool a 80° recuperou menos salsa do que quando foi usado álcool a 60°, sendo, então, escolhido o álcool a 80° na análise das sopas que contenham salsa ou outro condimento constituído por folhas e que esteja muito triturado, porque há menos recupe-

ração do condimento e não sobra muita farinha após a extração, o que facilita a identificação e contagem das sujidades leves.

Outra dificuldade encontrada foi na análise do macarrão porque aquele continha vegetais aderidos. Tentamos analisar o macarrão sem separar mecanicamente os vegetais. Realizamos um teste em algumas amostras de macarrão com os vegetais aderidos utilizando o método da peneira³; em alíquotas das mesmas amostras separamos os vegetais e analisamos o macarrão, após ter sido lavado e seco, pelo método da hidrólise ácida^{1,5}. Verificamos que, embora o método da peneira fosse mais fácil, porque, é eliminada a etapa de separação mecânica, era menos eficiente, porque comparando os resultados obtidos nos dois processos, verificamos que a recuperação das sujidades leves foi maior quando empregamos o método da hidrólise ácida.

Das 56 amostras de sopas desidratadas analisadas, 38 continham macarrão e 18 continham somente os ingredientes básicos. Com relação às 38 sopas que continham macarrão, 18 foram condenadas devido ao macarrão e 11 devido aos ingredientes moídos. Das 18 sopas condenadas devido ao macarrão, 14 (37,00%) continham número de fragmentos de insetos superior ao limite tolerado pela legislação vigente¹⁰; 4 (10,50%) continham pêlos de roedor, 1 (2,70%) continha ácaros e 1(2,70%) continha larvas de insetos. Das 11 condenadas devido aos ingredientes

moídos, 4(10,50%) continham número de fragmentos de insetos acima do limite tolerado pela legislação vigente; 4 (10,50%) continham pêlos de roedor; 4 (10,50%) continham insetos mortos; 1(2,70%) continha larvas de insetos mortas, 1 (2,70%) continha ácaros mortos^{6, 7, 11, 12, 13}.

Das 18 sopas que não continham macarrão, oito foram condenadas, quatro (22,20%) por conter número de fragmentos de insetos acima do limite tolerado pela legislação vigente¹⁰ e quatro (22,20%) por conter pêlos de roedor^{6,7,11,12,13}. Das 56 amostras, nove continham proteína texturizada de soja, sendo que 100% das amostras estavam em condições higiênicas satisfatórias, com relação àquele ingrediente^{9,14}.

CONCLUSÕES

À vista dos resultados obtidos pode-se concluir que os métodos utilizados deram bons resultados.

Pode-se também verificar que estão sendo empregadas matérias-primas em condições higiênicas insatisfatórias ou impróprias para o consumo na confecção de sopas, devendo ser contínua a inspeção nesse tipo de produto.

Conclui-se também, que o macarrão contribuiu para a condenação das sopas que continham esse ingrediente, principalmente com relação ao número de fragmentos de insetos.

RIALA6/696

ZAMBONI, C. Q.; ALVES, H. I.; ATUI, M. B. — Development of methods for light filth detection in powdered dehydrated soups. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 301-305, 1990.

ABSTRACT: Filth was detected in 56 samples of powdered dehydrated soups of the School Lunch Meal Program; 38 samples contained macaroni, dehydrated vegetables and ground ingredients such as maize flour, wheat flour, pea flour, bean flour, texturized soy protein, spices, milk powder and other ingredients; 18 samples did not contain macaroni, but only the basic ingredients. It was developed a method for separation of the soup ingredients before light filth extraction. The methods employed for light filth extraction were the AOAC's and AACC's methods. The results showed that from the 38 samples with macaroni, 18 were in unsanitary conditions due to macaroni, and 11 were disapproved because the ground ingredients. From the 18 samples containing only basic ingredients, 8 were disapproved; 4 (22,20%) because the number of insect fragments exceeds tolerated level and 4 (22,20%) because had rodent hairs. Nine of the 56 samples contained texturized soy protein. The analysis showed that the soy ingredient was in good sanitary condition. The conclusions were that the method developed gave good results and that the macaroni contributed to the soup unsanitary conditions more than the others ingredients.

DESCRIPTORS: dehydrated soups; light filth in, microscopical analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS — *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 8th ed. St. Paul, Minnesota, A.A.C.C., 1983. v. 1 (A.A.C.C. Method, 28 - 32.)
2. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS — *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8th ed. St. Paul, Minnesota, A.A.C.C., 1983, v. 1 (A.A.C.C. Method, 28 - 60.)
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington D. C., A.O.A.C., 1984. p. 901 (Tecn. 44.060).
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington D. C., A.O.A.C., 1984. p. 902 (Tecn. 44064).
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington D. C., A.O.A.C., 1984. p. 903. (Tecn. 44069).
6. Brasil Leis, decretos etc. — Resolução Normativa nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11507. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)
7. Brasil, Leis, decretos, etc. — Resolução Normativa nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 de jul. 1978, Seção I, pt. I, p. 11515. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas).
8. Brasil, Leis, decretos, etc. — Resolução Normativa nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 de jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11.525. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativa a alimentos (e bebidas).
9. Brasil, Leis, decretos, etc. — Resolução Normativa nº 14/78 da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 28 jun. 1978, Seção I, pt. I, p. 9896. Estabelece o padrão de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja.
10. BRASIL, Leis, decretos etc. — Portaria nº 1, de 4 de abril de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 8 de abril de 1986. Seção I, pt. I, p. 5039. Estabelece provisoriamente o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos a nível microscópico, em 100 (cem) gramas do produto... até que sejam concluídos os estudos da revisão da Resolução nº 12/78 — CNNPA.
11. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Decreto nº 37.106 de 31 de março de 1955. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, 2 abr. 1955. Seção I, p. 6051. Institui a Campanha da Merenda Escolar.
12. SÃO PAULO, Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de outubro de 1978. p. 17 (NTA 34). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
13. SÃO PAULO, Leis, decretos, etc. - Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21. out. 1978. p.17 (NTA 35). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
14. SÃO PAULO, Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p.18 (NTA 36). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
15. SÃO PAULO, Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 24 (NTA 49). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
16. SÃO PAULO Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 37 (NTA 77). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
17. ZAMBONI, C. Q. & RODRIGUES, R. M. M. S. — Comparação entre métodos para extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45: 13-20, 1985.
18. ZAMBONI, C. Q.; RODRIGUES, R. M. M. S.; BATTISTIC, M. A.; ALVES, H. I.; SPITERI, N. & ATUI, M. B. — Sujidades em farinhas de trigo, mandioca, milho e em fubá de milho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45: 89-93, 1985.
19. ZAMBONI, C. Q. & ATUI, M. B. — Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene de massas alimentícias por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49: 11-13, 1989.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.

ÓLEO DE AMÊNDOA DE PALMA (PALMISTE) BRASILEIRO: CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS*

Mário TAVARES**
Elza S. Gastaldo BADOLATO**
José Byron de CARVALHO**
Sabria AUED**

RIALA6/697

TAVARES, M.; BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. & AUED, S. — Óleo de amêndoa de palma (palmiste) brasileiro: caracterização e composição em ácidos graxos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 307-312, 1990.

RESUMO: Com o objetivo de caracterizar, física e quimicamente, o óleo de palmiste brasileiro, foram analisadas 11 amostras de óleo bruto, produzidas nos Estados da Bahia e do Pará. Os índices de iodo, refração e saponificação, o ponto de fusão e o teor de matéria insaponificável se enquadraram, de modo geral, dentro dos valores normalmente encontrados na literatura, enquanto a baixa acidez em 81,8% das amostras estudadas indicou que eram de boa qualidade, similares aos óleos da Malásia, o maior produtor mundial. A composição em ácidos graxos revelou que os óleos de palmiste nacional são altamente saturados, como os malásios, devido principalmente ao elevado conteúdo de ácido láurico. Com base nos dados experimentais, recomenda-se a inclusão do óleo de palmiste nas normas brasileiras relativas à identidade e qualidade de óleos e gorduras comestíveis.

DESCRITORES: óleo de palmiste, características físicas e químicas; ácidos graxos; *Elaeis guineensis* Jacq.

INTRODUÇÃO

A constatação de que o Brasil possui os maiores recursos em frutos oleaginosos nativos de todo o mundo remonta há muitos anos, quando se previa até que, da Região Amazônica, surgiriam os óleos vegetais que iriam abastecer o Hemisfério Ocidental^{1,2}. Apesar dessa potencialidade, poucos trabalhos têm sido publicados, e de modo esparso, com o objetivo de caracterizar, química e fisicamente, os óleos oriundos daqueles frutos, no contexto da busca de novas fontes oleaginosas com viabilidade econômica^{3,4,7,8,13,17,25,31}.

Dentro do aspecto acima, mereceria ser estudado, em nosso país, o óleo de palmiste que, embora não seja obtido de espécie genuinamente brasileira, o dendê, tem nesta oleaginosa o maior potencial de expansão no comércio mundial, su-

perando inclusive a soja e apresentando a Amazônia e o Sul da Bahia condições ideais para o seu cultivo^{1,20}. A propósito, a produção brasileira daquele óleo tem sido insignificante, restrita aos Estados da Bahia e do Pará, em face da ausência de uma política oficial agressiva de exploração do dendê²⁰.

Comercialmente, o óleo de palmiste é extraído da amêndoa do fruto da palmeira dendê (*Elaeis guineensis* Jacq), de origem africana, enquanto que da sua polpa extrai-se o óleo de palma^{1,19,21,23} mais conhecido no Brasil como azeite de dendê²⁹. Tanto a amêndoa como a polpa do dendê contêm cerca de 50% de óleo, na base seca^{15,28,34}, quando se emprega a variedade *tenera*, a mais produtiva²². Entretanto, o rendimento industrial em óleo é bem diferente, ou seja, 3,5% e 22%, respectivamente^{1,22,23,29}.

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos e no Laboratório da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 6º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Curitiba, 1990.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A despeito do baixo rendimento industrial, o óleo de palmiste tem uma destacada importância no cenário mundial pelo seu preço de venda relativamente baixo^{28,30}, largo consumo²⁷, admirável produção mundial^{19,27}, e multiplicidade de usos (formulação de margarinas e produtos de confeitaria, fabricação de sabões e detergentes, manufatura de oleoquímicos)^{11,30,32,37}. Ademais, estima-se que, para o ano 2000, os óleos de palma e de palmiste atinjam, somados, 44% da produção de óleos e gorduras de todo o mundo²⁴.

Quanto às características físicas e químicas do óleo de palmiste, a maior parte da literatura disponível diz respeito ao produto da Malásia, o maior produtor mundial¹⁹, e, esporadicamente, de países da África Ocidental e da América do Sul^{9,18,21,26,30,32,33,34}. O óleo malásio é altamente sólido, tem cor variando de amarelo-claro a amarelo-pardacento³⁷ e composição bem similar à do óleo de coco. Apresenta, entre os ácidos graxos, o ácido láurico como o maior componente de 46 a 51%^{30,32,34,37}, ao contrário do óleo de palma cujos componentes majoritários são os ácidos palmítico e oléico^{10,16,18,21,23,31,35,36}. Por isso, aqueles óleos são considerados os mais importantes, do ponto de vista comercial, dentro do grupo de ácido láurico³⁷. Para o óleo de palmiste são mencionadas algumas características químicas, como os índices de iodo entre 16,2 e 19,2, e de saponificação, de 243 a 249, e o teor de matéria insaponificável de 0,1 a 0,8%, e físicas, como ponto de fusão entre 25,9 e 28,0°C, e índice de refração a 40°C na faixa de 1,4500 a 1,4518^{26,32,34}.

Em termos de qualidade, para fins comerciais, o teor de ácidos graxos livres (AGL) do óleo de palmiste é considerado fator decisivo^{2,15}. A maior causa da perda de sua qualidade é a contaminação por fungos, tendo como consequência um significativo aumento dos AGL². O óleo refinado, de boa qualidade, é comercializado à base de 0,1% de AGL², expresso em ácido láurico, enquanto que, para o óleo bruto, com fins de exportação, é tolerável um teor máximo de 5,0%, que está acima dos padrões apresentados pelos óleos da Malásia, situados entre 2,0 e 3,5%²⁶.

Considerando que a legislação brasileira vigente⁹ não inclui o palmiste entre os óleos e gorduras comestíveis, para os quais estabeleceu padrões de identidade e qualidade, e a escassez de trabalhos publicados sobre a caracterização física e química do óleo de palmiste brasileiro, o presente trabalho tem por objetivo determinar um perfil de sua composição em ácidos graxos e algumas características de identidade e qualidade, com vistas a futura revisão dos referidos padrões.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 11 amostras de óleo bruto de palmiste, fornecidas pelos próprios fabricantes, sendo 8 produzidas no Estado do Pará, codificadas como D-1, P-1, P-2, DP-1, DP-2, DP-3, DP-4 e DP-5, e 3 no Estado da Bahia, tendo os códigos OD-1, OP-1 e OP-2.

Segundo informações dos produtores, as amostras paraenses foram processadas a partir de frutos do dendê da variedade *tenera*, enquanto as baianas empregaram, intercaladamente, as variedades *dura* e *tenera*.

A análise dos ácidos graxos foi efetuada por cromatografia em fase gasosa dos ésteres metílicos, conforme o processo indicado nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁴. Foi usado um cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama marca CG, modelo CG-500, acoplado a um integrador.

Os componentes foram separados em coluna capilar Carbowax 20 M, de 25 metros. Foram observadas, entre outras, as seguintes condições de operação: temperatura do injetor, 230°C; temperatura do detector, 240°C; temperatura da coluna, programada de 100 a 220°C. A quantificação dos ácidos graxos foi efetuada por normalização interna de área.

Em todas as amostras, foram determinados os índices de saponificação e de refração a 40°C, a acidez e o ponto de fusão, de acordo com a metodologia descrita na Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁴. O teor de matéria insaponificável foi obtido pelo método preconizado pela AOCS⁵, e o índice de iodo com base na composição em ácidos graxos pre-determinada⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a composição em ácidos graxos dos óleos de amêndoa de palma brasileiro estudados.

Pelos resultados obtidos, observou-se que a composição em ácidos graxos do óleo de palmiste brasileiro ficou compreendida dentro dos limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*¹⁰, à exceção dos ácidos caprílico (C8:0) e esteárico (C18:0).

Se a composição em ácidos graxos do óleo de palmiste paraense obtida for comparada com aquela verificada por SERRUYA et alii³¹, deduz-se que não houve diferença significativa. O mesmo se pode afirmar da comparação, entre si, dos óleos procedentes da Bahia e do Pará, envolvidos

TABELA 1

Composição em ácidos graxos de óleos de amêndoa de palma brasileiro.

Amostras	Ácidos graxos (%)									
	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	Saturados	C18:1	C18:2	Insaturados
D-1	2,2	2,8	51,6	17,5	8,0	1,8	83,9	13,6	2,4	16,0
P-1	3,0	3,1	45,0	16,2	10,3	2,3	78,9	18,1	2,0	20,1
P-2	5,7	5,3	44,7	16,2	10,0	3,4	85,3	12,6	2,0	14,6
DP-1	3,7	3,6	52,4	17,2	7,4	1,7	86,0	12,1	1,9	14,0
DP-2	4,0	3,7	52,2	17,0	7,4	1,8	86,1	11,1	2,8	13,9
DP-3	3,8	3,5	51,6	17,3	7,7	1,9	85,8	12,1	2,1	14,2
DP-4	3,7	3,5	52,8	17,9	7,8	1,1	86,8	10,9	2,3	13,2
DP-5	3,3	3,2	49,4	17,1	8,2	2,0	83,2	14,4	2,3	16,7
OD-1	3,3	3,2	48,2	17,0	8,4	2,1	82,2	14,9	2,9	17,8
OP-1	3,7	3,6	49,9	17,3	8,2	2,3	85,0	12,9	2,1	15,0
OP-2	4,2	3,8	51,6	17,6	7,7	2,1	87,0	11,2	1,8	13,0

TABELA 2

Características físicas e químicas de óleos de amêndoa de palma brasileiro.

Amostras	Acidez, em ácido láurico (%)	Índice de Iodo*	Índice de refração a 40°C	Índice de saponificação	Ponto de fusão (°C)	Matéria insaponificável (%)
D-1	1,0	15,8	1,4515	249,2	28,8	0,7
P-1	6,8	18,9	1,4514	247,8	27,0	1,0
P-2	3,2	14,3	1,4503	252,0	25,0	0,6
DP-1	1,5	13,7	1,4514	247,8	31,4	0,6
DP-2	1,5	14,3	1,4514	247,8	31,4	0,6
DP-3	1,5	13,9	1,4513	249,2	31,2	0,6
DP-4	1,5	13,2	1,4513	247,8	31,2	0,6
DP-5	1,5	16,3	1,4513	249,2	31,2	0,6
OD-1	6,5	17,7	1,4505	252,0	27,0	0,9
OP-1	0,9	14,6	1,4509	250,6	29,0	0,8
OP-2	0,9	12,6	1,4509	252,0	29,0	0,7

* Calculado com base na composição em ácidos graxos.

no presente estudo, ou com o óleo da Malásia. Entretanto, este último apresenta faixas de variação mais estreitas do que o brasileiro, graças à maior uniformidade do fruto de dendê, cultivado no citado país¹⁷. Pode-se, portanto, dizer que, com base na composição em ácidos graxos, os óleos do Brasil e da Malásia são altamente saturados, devido principalmente ao elevado teor de ácido láurico, o que lhes confere excelente estabilidade contra a rancidez oxidativa^{34,37}.

Os resultados encontrados neste trabalho acrescentam ao referido na literatura^{30,32,33,34} de que o óleo de palmiste brasileiro tem composição em ácidos graxos semelhante à dos óleos de coco, de babaçu^{22,23,28} e de amêndoa de inajá³¹.

O fato de ter sido empregada a variedade *tenera* do fruto de dendê, a mais produtiva em óleo²², na extração de todos os óleos de palmiste parense e, alternadamente, as variedades *tenera* e

dura no processamento dos óleos baianos, parece não ter influenciado na composição em ácidos graxos das amostras analisadas.

A tabela 2 apresenta as características físicas e químicas dos óleos de amêndoa de palma brasileira analisados.

Relativamente à acidez, expressa em ácido láurico, observou-se que duas amostras (P-1 e OD-1) apresentaram valores acima do teor máximo de 5,0%, tolerável para fins de exportação do óleo em bruto²⁶. Isso indica, principalmente, que os frutos de dendê não foram rapidamente processados, permitindo, então, a ação de enzimas lipolíticas e o conseqüente aumento da acidez da amêndoa, matéria-prima para a extração do óleo de palmiste, e da polpa^{16,35}. As demais amostras analisadas, por sua vez, se enquadraram nos padrões dos óleos malásios, cuja acidez varia de 2,0 a 3,5%³⁶, revelando boa qualidade.

Já com respeito aos índices de iodo e de refração, as deduções podem ser feitas na mesma linha das utilizadas para a composição em ácidos graxos, visto que essas três características químicas estão diretamente relacionadas ao grau de insaturação dos óleos e gorduras.

Os valores encontrados para estes índices também ficaram compreendidos na faixa de variação adotada pelo *Codex Alimentarius*¹⁰, exceto no caso da amostra OP-2, cujo índice de iodo (12,6) se afastou do limite mínimo, que é de 13. A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os de SERRUYA et alii³¹, para óleo de palmiste paraense, ou com o óleo malásio, demonstra uma similaridade, permitindo confirmar que tanto o óleo de palmiste do Brasil como o da Malásia são altamente saturados.

Quanto ao índice de saponificação, observou-se que o óleo de palmiste brasileiro se colocou dentro dos limites dados pelo *Codex Alimentarius*¹⁰, mas com valores superiores ao óleo paraense, segundo SERRUYA et alii³¹. Sete (63,64%) das amostras analisadas apresentaram valores acima do limite máximo referido na literatura^{26,32,34} para o óleo malásio, sugerindo que o óleo de palmiste brasileiro contém níveis mais elevados de ácidos graxos de baixo peso molecular.

No que concerne ao ponto de fusão (PF), oito amostras de óleo de palmiste nacional apresentaram valores acima do limite máximo relatado para o óleo malásio, que é de 28°C, e apenas uma (amostra P-2) apresentou valor abaixo do mínimo^{26,32,34}. Uma possível explicação para os valores relativamente baixos do ponto de fusão determinados nas amostras P-2, P-1 e OD-1 está baseada na elevada acidez que, conjuntamente com produtos de oxidação, contribuiria para abaixar sua temperatura de fusão³⁵. Devemos destacar que nem o *Codex Alimentarius*¹⁰, nem o trabalho de SERRUYA et alii³¹, fazem menção ao ponto de fusão do óleo de palmiste, impossibilitando, portanto, qualquer discussão.

Com relação à matéria insaponificável, o óleo de palmiste do Brasil apresentou teores enquadrados na faixa recomendada pelo *Codex Alimentarius*¹⁰, sendo que uma amostra (P-1) superou ligeiramente o limite máximo. Todos os valores foram superiores aos do óleo paraense, pesquisado por SERRUYA et alii³¹, e duas amostras (P-1 e OD-1) ultrapassaram o teor máximo de 0,8% dos óleos da Malásia^{26,32,34}. Então, seria interessante o estudo desse componente minoritário, quanto aos constituintes polares, álcoois triterpênicos, metilesteróis e esteróis, já identificados em óleos brutos da Indonésia³³, e até carotenos, determinados em óleo da Malásia^{32,34}.

É importante ressaltar que todas as características físicas e químicas do óleo de palmiste brasileiro poderão ser significativamente diversificadas, caso passe a ser processada também, comercialmente, a amêndoa dos frutos do dendê da palmeira *Elaeis oleifera*, nativa da Amazônia, conhecido como "caiaué"¹¹. O projeto desenvolvido dentro do Programa Nacional de Pesquisa de Dendê (PNP-Dendê), criado em 1980 pelo governo brasileiro^{11,20}, concluiu que o óleo de palmiste, dela obtido, é menos saturado do que aquele extraído do dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq., possibilitando a ampliação dos usos desse óleo¹. Ressalte-se ainda que tais características podem ser alteradas, de maneira acidental, se parte da polpa for prensada junto com a amêndoa, já que o óleo de palma, extraído da primeira, misturar-se-ia ao de palmiste²⁶.

CONCLUSÃO

As características físicas e químicas dos óleos de palmiste brasileiro analisados enquadraram-se, de modo geral, dentro dos valores normalmente encontrados na literatura.

Os óleos de palmiste nacional estudados não apresentaram diferença significativa entre si e se revelaram altamente saturados, como os da Malásia, devido principalmente ao elevado conteúdo de ácido láurico.

A maioria dos óleos de palmiste apresentou acidez similar aos óleos malásios, podendo ser considerados de boa qualidade. Já as duas amostras que mostraram elevada acidez indicam a necessidade de melhoria nas condições de colheita e extração do óleo.

Recomenda-se, com base nos dados experimentais, a inclusão do óleo de palmiste nas normas brasileiras relativas à identidade e qualidade de óleos e gorduras comestíveis, em face das múltiplas aplicações, inclusive como substituto do óleo de coco, e promissoras perspectivas no cenário mundial.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro à presente pesquisa. Agradecem também ao Prof. Daniel Barrera Arellano, ao Dr. Davi Venâncio e às empresas OPALMA — Óleos de Palma S/A. Agroindustrial, OLDESA — Óleo de Dendê S/A. e DENPASA — Dendê do Pará S/A. pelo fornecimento de amostras para execução da parte experimental.

TAVARES, M.; BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. & AUED, S. — Brazilian palm kernel oil: characterization and fatty acid composition. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 307-312, 1990.

ABSTRACT: Eleven samples of crude Brazilian palm kernel oil, from Bahia and Pará States, were analysed by physical and chemical indexes. The iodine, refraction and saponification indexes, the melting point and the unsaponifiable matter content were, in general, within the range considered to be normal. The low content of free fatty acids of 81,8% among the samples analysed, indicated good quality of the oil. It was similar to that of oil from Malaysia, the biggest world producer. The fatty acid composition revealed higher saturation of Brazilian palm kernel oils, due mainly to the high content of lauric acid. Considering the experimental data obtained, it was recommended that the palm kernel oil be included in the Brazilian legal standards, with respect to edible oils and fats.

DESCRIPTORS: palm kernel oil, physical and chemical characteristics; fatty acids; *Elaeis guineensis* Jacq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A CULTURA do dendê na Amazônia. [Belém Dendê do Pará S.A. — DENPASA, s.d.]
2. AIREDE, C.E. & E. SURUOSO. — Deterioration of shelled oil palm kernels by seedborne fungi. *J. Sci. Food Agric.*, 40: 293-304, 1987.
3. ALDRIGUE, M.L. & SAMPAIO, Z.S. — Identificação botânica e caracterização física, química do urucuri (*Attalea excelsa* Mart.) em Rio Branco. *Bol. SBCTA*, 23: 110, 1989.
4. AMAYA-FARFÁN, J.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; CRUZ, P.N. & MARQUES, E.P. — Fatty acid and amino acid composition of some indigenous fruits of Northeastern Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 6: 86-92, 1986.
5. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Commercial fats and oils. In: *Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, A.O.C.S., 1983. v.2, Section C.
6. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Industrial oils and derivatives. In: *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, A.O.C.S., 1989. v.1, Section C.
7. BENTES, M.H.S.; SERRUYA, H.; ROCHA FILHO, G.N.; GODOY, R.L.O.; CABRAL, J.A.S. & MAIA, J.G.S. — Estudo químico das sementes de bacuri. *Acta amazônica*, 16/17: 363-8, 1986/7.
8. BERGER, K. — Palm oil products: why and how to use them. *Food Technol.*, 40: 72-9, 1986.
9. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 22/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 06 set. 1977. Sec.I, pt. I, p. 11807-10. Estabelece padrão de identidade e qualidade para os óleos e gorduras comestíveis, destinados à alimentação humana.
10. CODEX Alimentarius Commission. *Codex standards for edible fats and oils*. Rome, FAO/WHO, 1982. v.11.
11. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê. — *Dendê: uma nova opção agrícola*. 2ª ed. Manaus, EMBRAPA, DDT, 1986. (EMBRAPA — CNPSD. Documentos,4).
12. HENTUS, F. — Óleos do Amazonas. *Fazenda*, 38: 407-8, 1943.
13. HIANE, P.A.; RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M. & PEREIRA, J.G. — Caracterização química de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 5ª, Salvador, 1989.
14. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. São Paulo. — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, I.O.E., 1985. p. 245-66.
15. KERSHAW, S.J. & HARDWICK, J.F. — Some aspects of the commercial contractual analysis of palm Kernels. *Oléagineux*, 40: 397-403, 1985.
16. LAGO, R. C. A. & HARTMAN, L. — *Composição de óleo de dendê brasileiro*. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA, 1987. [EMBRAPA-CTAA. Boletim de pesquisa, 14].
17. LAGO, R. C. A.; PEREIRA, D.A.; SIQUEIRA, F. A. R.; SPIZZI, R.R. & OLIVEIRA, J.P. DE — Estudo preliminar das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia, *Acta*, 16/17: 369-76, 1986/7.
18. MACFARLANE, N.; SWETMAN, T. & CORNELIUS, J.A. — Analysis of mesocarp and from the American oil palm and 1 hybrids with kernal oils the west African oil palm. *J. Sci. Food Agric.*, 26: 1293-8, 1975.
19. MALAYSIAN palm oil update. *Palmoil Update*, 10: 17, 1990.
20. MATIAS, I. — Dendê: tudo para liderar. *Globo Rural*, 42: 71-4, 1989.
21. MORETAIN, J.P. & BEZARD, J.A. — Les triglycerides monoinsaturés de l'huile de palmiste. *Rev. fr. Corps Gras*, 24: 303-14, 1977.
22. NOTHEMBERG, M. - Dendê ameaça hegemonia mundial do óleo de soja. *Quím. deriv.*, 22: 10-7, 1987.
23. PANDOLFO, C. - *A cultura do dendê na Amazônia*. Belém, SUDAM, 1981.

TAVARES, M.; BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. & AUED, S. — Óleo de amêndoa de palma (palmiste) brasileiro: caracterização e composição em ácidos graxos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 307-312, 1990.

-
24. PARANJOTHY, K. — Recent developments in cell and tissue culture of oil bearing palms. *PORIM occas Pap.* (Palm Oil Res. Inst. Malaysia) (19): 1-12, 1986.
25. PINTO, G.P. — Características físico-químicas e outras informações sobre as principais oleaginosas do Brasil. *Bol. Téc. IPEANE*, 18:53-5, 1963.
26. PRITCHARD, J.R. — Oilseed quality requirements for processing. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 60: 274 A- 84 A, Feb. 1983.
27. RECORD palm oil production forecast. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 66: 1026-42, 1989.
28. REIS, J.C. & POLIAKOFF, J. — Pesquisas em torno do aproveitamento integral do óleo de dendê produzido na Bahia. *Inst. Tecnol. Bahia*, 26: 1-36, 1960.
29. RODRIGUES, E. — Informações gerais sobre o dendezeiro. *Aliment. Tecnol.*, 1: 46, jul/ago. 1986.
30. SANTIAPILLAI, J.R. - Availability and cost competitiveness of palm oil and palm Kernel oil in non-food uses. *Palm Oil Dev.* (Palm Oil Res. Inst. Malaysia) (5): 1-6, 1986.
31. SERRUYA, H.; BENTES, M.H.S.; SIMÕES, J.S.; LOBATO, J.E.; MULLER A.H. & ROCHA FILHO, G.N. - Análise dos óleos dos frutos de 3 palmáceas da Região Amazônica. *An. Ass. bras. Quím.*, 31: 93-6, 1980.
32. SIEW, W.L. & BERGER, K.G. — Malaysian palm Kernel oil: chemical and physical characteristics. *PORIM Technol.* (Palm Oil Res. Inst. Malaysia) (6): 1-7, 1986.
33. SONNTAG, N.O.V. — Composition and characteristics of individual fats and oils. In: SWERN, D. ed. *Bailey's industrial joi and fat products*. 4^a ed. New York, John Wiley, 1982. v.1, c. 6, p. 374-82.
34. TANG, T.S. & TEOH, P.K. — Palm Kernel oil extraction — the Malaysian experience. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 62: 254-8, 1985.
35. TANGO, J.S.; LACAZ, P.A.A.; SANTOS, L.C. dos; TURATTI, J.M.; SILVA, M.T.C.; FIGUEIREDO, I.B. de; MANTOVANI, D.M.B. & CAMPOS, S.D. da S. de — Características físicas e químicas do óleo de dendê. *Bol. ITAL*, 18: 509-42, 1981.
36. TAVARES, M. & BARBERIO, J.C. — Composição em ácidos graxos do azeite de dendê (*Elaeis guineensis Jacq.*) brasileiro. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 25: 5-15, jan/jun. 1989.
37. YOUNG, F.V.K. — Palm Kernel and coconut oils: analytical characteristics, process technology and uses. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60: 326 A - 31 A, Feb. 1983.

Recebido para publicação em 11 de abril de 1990.

RECONHECIMENTO BOTÂNICO DA ESPÉCIE ERYTHRINA SPECIOSA ANDR. (MULUNGU)*

Luzia Ilza Ferreira JORGE**

RIALA6/698

JORGE, L. I. F. — Reconhecimento botânico da espécie *Erythrina speciosa* Andr. (mulungu). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 313-317, 1990.

RESUMO: Estudamos a folha e a casca de *Erythrina speciosa* Andr., destacando os elementos histológicos de importância na diagnose e na diferenciação dessa espécie em relação a outras do mesmo gênero, conhecidas como mulungu.

DESCRITORES: *Erythrina speciosa* Andr.; mulungu; suinã; corticoira; sananduva.

INTRODUÇÃO

A ação curarizante das *Erythrinas* e seu conteúdo em alcalóides têm sido estudados por MANSKE & HOLMES, afirmava TOLEDO⁶. Na verdade, esses alcalóides continuam a ser intensamente estudados em relação à sua estrutura química até os dias de hoje. E este avanço contrasta com a carência de estudos farmacológicos e toxicológicos. Sendo assim, permanecem as incertezas quanto à espécie mais apropriada para emprego medicinal, bem como seus efeitos colaterais e tóxicos.

TOLEDO⁶ afirma que a droga oficial é *Erythrina verna* Vell., entretanto, a descrição que apresenta das cascas de *Erythrina verna* Vell. não corresponde àquela encontrada na Farmacopéia Brasileira 1ª edição².

TOLEDO⁶ também, já em sua época, alertava para os efeitos tóxicos de uma dosagem excessiva da droga: "O uso empírico da casca de *Erythrina verna* Vell., assim como da folha e da semente, em forma de infusão ou xarope caseiro pelo povo, não está isento de perigos, se considerarmos a atividade fisiológica dessa espécie".

A espécie *Erythrina speciosa* Andr. é muito

abundante no bairro de Pinheiros, sendo empregado na arborização das ruas. PIO CORREA⁴ refere-se a essa espécie como *Erythrina mulungu* Mart., sedativa, útil nas moléstias do fígado. Sua madeira, rica em fibras, presta-se à produção de papel. PIO CORREA⁴ afirma que *Erythrina verna* Vell. apresenta folíolos muito parecidos com os de *Erythrina speciosa* Andr., porém mais tênues, com nervuras menos proeminentes, sem espinhos sobre o pecíolo comum. *Erythrina verna* Vell. e *Erythrina speciosa* Andr. têm porte e habitat diferentes. *Erythrina speciosa* Andr. é árvore baixa, cerca de três metros de altura, ocorrendo em Minas Gerais e em São Paulo. *Erythrina verna* Vell., originária da Bahia, é árvore grande, podendo atingir até 15 metros de altura^{1,4}.

O objetivo deste trabalho é fornecer dados estruturais que facilitem a distinção entre ambas as espécies, *Erythrina verna* Vell. e *Erythrina speciosa* Andr., uma vez que estas parecem ser as espécies mais empregadas medicinalmente.

MATERIAL E MÉTODO

Erythrina speciosa Andr. foi colctada nas ruas do bairro de Pinheiros, onde é muito abundante como planta ornamental.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Erythrina verna Vell. foi adquirida no comércio da cidade de São Paulo.

Foram estudadas as folhas e as cascas. Foram empregados cortes a mão livre, microprojecção e corantes histológicos.

RESULTADOS

Características macroscópicas

Erythrina speciosa Andr. é árvore de aspecto geral "atarracado", copa ampla, porte médio (cerca de 3 metros de altura), casca avermelhada, grossa, enrugada transversalmente, sulcada longitudinalmente, com protuberâncias puntiformes de súber e ritidoma, que se descama. Internamente, a casca é clara, quase branca; camadas de fibras, alternadas com camadas de células parenquimáticas, percorrem o caule longitudinalmente, propiciando a fratura neste sentido. O sabor é amargo, devido aos alcalóides. Espinhos triangulares ocorrem no caule, nos ramos e nas nervuras foliares. As folhas são longamente pecioladas, trifolioladas; folíolos largos, romboídeos. As flores são vermelhas, muito vistosas, ocorrendo em junho, julho e agosto, quando o vegetal perde as folhas inteiramente.

Características anatômicas

Folhas

Erythrina speciosa Andr. apresenta nervuras foliares salientes em ambas as faces, porém mais proeminentes na face inferior.

Ambas as espécies são estomatíferas, com ligeira predominância quantitativa na epiderme inferior. São estômatos paracíticos em sua maioria. Observadas em corte paradérmico, as células epidérmicas apresentam paredes delgadas, de contorno arredondado ou ligeiramente sinuoso (Fig. 2-A e Fig. 2-B). A cutícula é bastante lipofílica, corando-se intensamente pelo Sudam III (xerofitismo).

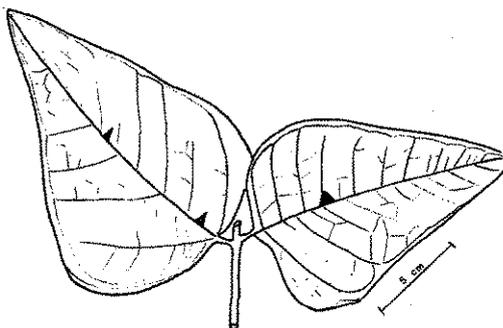


FIGURA 1 — *Erythrina speciosa* Andr. — folhas

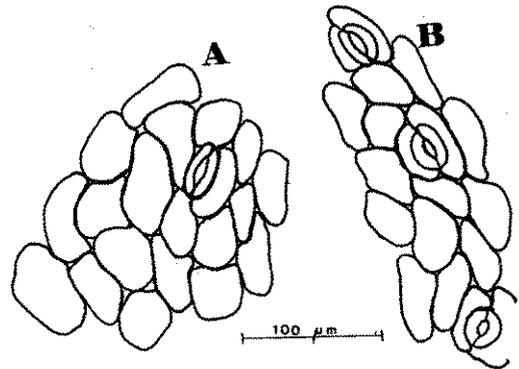


FIGURA 2 — *Erythrina speciosa* Andr. — 2A— Epiderme superior em corte paradérmico. 2B— Epiderme inferior em corte paradérmico.

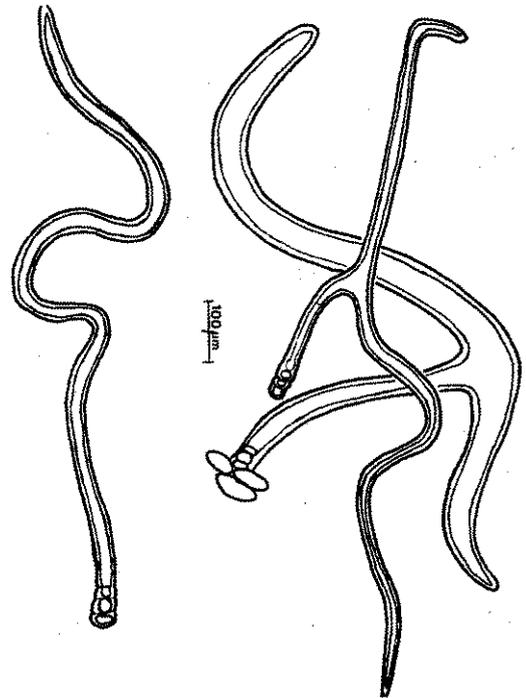


FIGURA 3 — *Erythrina speciosa* Andr. — Tricomas tectores.

Ocorrem tricomas tectores em ambas as epidermes, sobre as nervuras. São tricomas muito grandes, aproximadamente um milímetro de comprimento. Assumem o aspecto de uma "rede" de filamentos esbranquiçados ao estereomicroscópio. Observados ao microscópio óptico apresentam-se como tricomas de um ou dois braços, constituídos de uma célula distal, e uma base constituída de duas ou três células pequenas, achatadas (Fig. 3). Os poros estomáticos são alongados. O mesófilo é dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico discreto, grandes e abundantes cloroplastos.

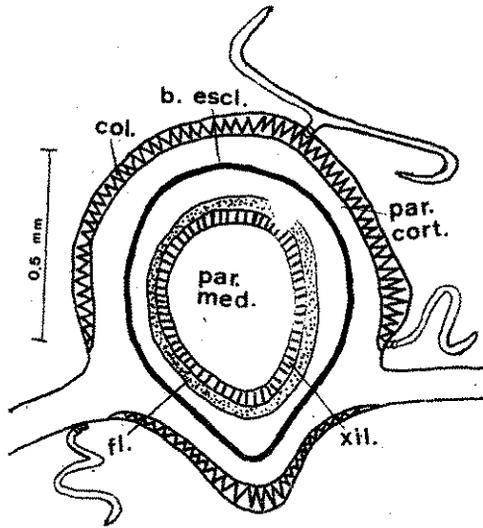


FIGURA 4 — *Erythrina speciosa* Andr. — Desenho esquemático da nervura central: col.: colênquima; par. cort.: parênquima cortical; b. escl.: bainha esclerenquimática; xil.: xilema; fl.: floema; par. med.: parênquima medular.

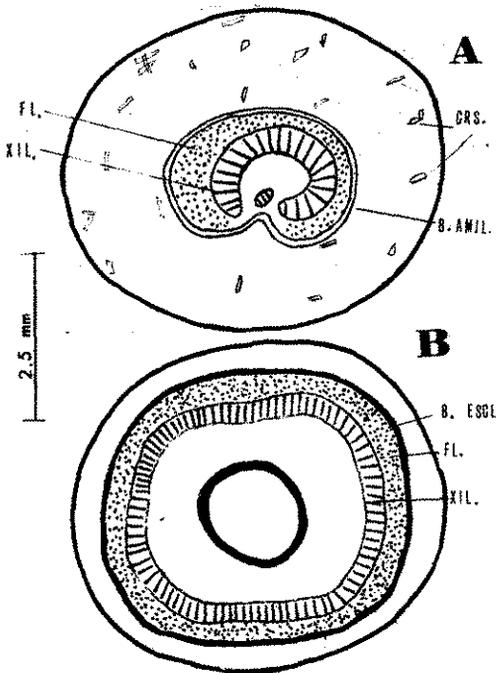


FIGURA 5 — *Erythrina speciosa* Andr. — 5A— Desenho esquemático do pecíolo: cr.: cristais; b. amil.: bainha amilífera; fl.: floema; xil.: xilema. 5B— Desenho esquemático do pecíolo: b. escl.: bainha esclerenquimática; fl.: floema; xil.: xilema.

As células epidérmicas são retangulares, alongadas no sentido tangencial quando observadas em corte transversal.

A região da nervura central apresenta aspecto muito peculiar, duplamente proeminente, mais proeminente na face inferior do que na face superior (Fig. 4). Há uma região de células parenquimáticas medulares, circundada por um "anel" de feixes colaterais, em disposição contínua devido ao crescimento secundário. Todo o conjunto é envolto por uma bainha esclerenquimática. Colênquima de localização sub-epidérmica ocorre em ambas as faces.

O pecíolo apresenta cutícula espessa, podendo ou não ocorrer colênquima em algumas porções. Ocorrem cristais em forma de estilete no parênquima cortical. Os cristais aciculares grandes representados na casca (Fig. 6) são procedentes da solução de lugol e não do vegetal. No pecíolo, a bainha esclerenquimática é substituída por uma bainha amilífera, contígua ao floema.

O pecíolo é fistuloso. Abaixo da epiderme ocorrem três ou quatro camadas de colênquima. O feixe vascular é envolto por uma bainha esclerenquimática contígua ao floema, como observado em relação à bainha amilífera do pecíolo.

Cascas

O súber é constituído de várias camadas de células de formatos poliédricos quando observadas de face. As paredes celulares são grossas, de coloração amarelada que persiste mesmo após tratamento com solução de hipoclorito de sódio a 10%. Observado em corte transversal, o súber apresenta várias camadas celulares extremamente compactadas, a ponto de não se destacarem as paredes que delimitam as células.

Fibras alongadas, simples ou cristalíferas, lignificadas, pois coram com solução clorídrica de floroglucina, ocorrem em grupos, alternados com camadas de células parenquimáticas corticais.

Entre as células parenquimáticas corticais são encontrados idioblastos contendo grãos de amido e/ou osteoesclereídeos (Fig. 6). Não há células pétreas.

Nos raios parenquimáticos há grande quantidade de idioblastos contendo grãos de amido, constituindo verdadeiras "faixas de coloração azul-marinho" quando juntamos solução de lugol à preparação.

A solução de amido pode conter cristais aciculares grandes, procedentes da cristalização do iodo, sem nenhuma relação com o vegetal em estudo (Fig. 6).

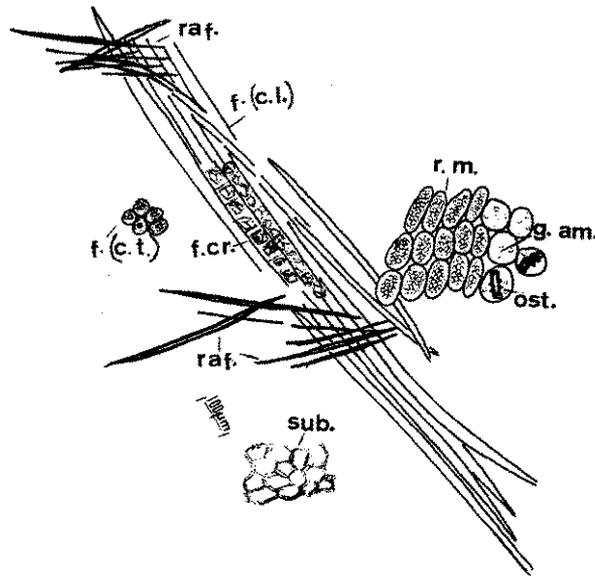


FIGURA 6 — *Erythrina speciosa* Andr. - Fragmentos de cascas caulinares: f. (c. t.): fibras (cortadas transversalmente); f. (c. l.): fibras (cortadas longitudinalmente); f. cr.: fibras cristalíferas; r. m.: raios medulares; g. am.: grãos de amido; raf.: cristais de iodo; ost.: osteoesclereídeos; sub.: células de súber em vista facial.

DISCUSSÃO

A presença de bainha esclerenquimática em dicotiledôneas xerófitas (leguminosas, mirtáceas etc) pode ser racionalizada como recurso desenvolvido pela planta no sentido de obter rigidez e isolamento do meio-ambiente drástico em que vegetam, com alta luminosidade e calor intenso. Essa teoria é ainda corroborada pelo fato desta bainha esclerenquimática ocorrer justamente nas partes tenras do vegetal, que apresentam pouca estrutura secundária: nervuras, pecíolos e peciólulos.

As cascas de *Erythrina verna* Vell. foram bem descritas por TOLEDO⁶, com desenhos das células pétreas presentes no parênquima cortical, fibras pericíclicas rodeadas de fibras cristalíferas, súber em três extratos, células parenquimáticas com inclusões (ceratênquima).

TOLEDO⁶ afirma que a espécie *Erythrina verna* Vell. é a de emprego oficial. Contudo, a descrição que apresenta das cascas *Erythrina verna* Vell. é totalmente diversa da espécie *Erythrina mulungu* Martius, relatada na Farmacopéia Brasileira, por SILVA². Por sua vez, a *Erythrina speciosa* Andr., que acabamos de descrever, difere tanto em relação à espécie estudada por TOLEDO⁶, como em relação àquela estudada por SILVA².

Com exceção da presença de epiderme papilosa ou sub-papilosa a que se referem METCALFE & CHALK³ para as papilionáceas em geral, observamos que *Erythrina speciosa* Andr. segue o padrão histológico deste grupo vegetal^{3,5}: tipos de tricomas tectores, cristais em estilete, cristais prismáticos, regiões amilíferas, bainha esclerenquimática etc.

CONCLUSÕES

O porte do vegetal, juntamente com as características macroscópicas de suas folhas, permitem o reconhecimento da espécie *Erythrina speciosa* Andr. Contudo, as características histológicas foliares são pouco distintas para a espécie.

As cascas caulinares, contrariamente ao que se observa em vegetais de outras famílias, oferecem várias informações de importância diagnóstica: frequência e distribuição de grãos de amido, tipos de fibras, cristais, ocorrência ou não de células pétreas, tipo de súber etc.

Agradecimento

Agradecemos à pesquisadora Lúcia Rossi, do Instituto de Botânica, São Paulo, Capital, pela identificação da espécie *Erythrina speciosa* Andr.

RIALA6/698

JORGE, L. I. F. — Botanical recognition of the species *Erythrina speciosa* Andr. (mulungu). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 313-317, 1990.

ABSTRACT: We investigated leaf and bark of *Erythrina speciosa* Andr., describing the most important histological elements to recognize and differentiate this specie from another of the same genus, known as mulungu.

DESCRIPTORS: *Erythrina speciosa* Andr., mulungu, suinã, corticeira, sananduva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRUZ, G.L. — *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Civilização Brasileira, 1982. p. 402 e 464.
2. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo, Ed. Nacional, 1929. p. 592-3.
3. METCALFE, C.R. & CHALK, L. — *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 1950. v.1. p. 476-535.
4. PIO-CORREA, M. — *Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1978. v.5. p. 260-4.
5. SOLEREDER, H. — *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 1908. v.1. p. 253-305.
6. TOLEDO, T.A.N. — Estudo farmacognóstico da *Erythrina verna* Vell. *An. Fac. Farm. Odont. da Univ. S. Paulo*, 11: 55-64, 1953.

Recebido para publicação em 2 de maio de 1990

ISOLAMENTO DE *ASPERGILLUS* SPP, AFLATOXIGÊNICOS DE
PRODUTOS ALIMENTÍCIOS — SÃO PAULO, CAPITAL *

Dilma Scala GELLI**
Miyoko JAKABI**
Edward PORTO***

RIALA 6/699

GELLI, D. SA. JAKABI, M. & PORTO, E. — Isolamento de *Aspergillus* spp aflatoxigênicos de produtos alimentícios — São Paulo, Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 319-323, 1990.

RESUMO: Foram analisadas 264 amostras de produtos alimentícios, tais como: condimentos, mel, pós para o preparo de alimentos, produtos amiláceos e outros. Destas amostras foram isoladas 269 cepas do gênero *Aspergillus*, sendo identificados nove grupos e quatro espécies. Após cultura em caldo extrato de levedura com 20% de sacarose ("yeast extract medium-sucrose"), foi efetuada análise, por cromatografia em camada delgada em sílica gel, para detecção de aflatoxinas em 215 cepas. A pesquisa de aflatoxinas revelou-se positiva em seis amostras (2,79%), como segue: duas amostras de mel, uma de condimento, duas de produtos amiláceos e uma de pó para o preparo de bebida láctea. As cepas aflatoxigênicas foram: 3 (2,91%) de *Aspergillus* spp; 2(2,66%) do grupo *flavus* e 1 (4,35%) de *Aspergillus flavus*, Link.

DESCRITORES: produtos alimentícios; fungos aflatoxigênicos; *Aspergillus* spp aflatoxigênicos, isolamento.

INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, em 1960, as aflatoxinas são objeto de estudo, no que diz respeito à caracterização, poder toxigênico, ocorrência e identificação das cepas de microorganismos capazes de produzi-las. O estudo desta classe de substâncias está caracterizado como um problema real de saúde pública^{1,6,13}.

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂, são classificadas em função de apresentarem fluorescência característica azul ("blue") e verde ("green"), respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta. As aflatoxinas M₁ e M₂, são metabólicos tóxicos ("milk toxin"), excretados no leite de mamíferos que consomem rações contaminadas, respectivamente, com aflatoxinas B₁ e B₂. Os *Aspergillus* que produzem essas micotoxinas são principalmente o *A. flavus* e *A. parasiticus*. Estas toxinas são consideradas tóxicas, teratogênicas e agentes de mutagênese e carcinogênese¹⁴.

A incidência de fungos nos alimentos é alta, em especial no nosso país. Os fungos são quantificados e mantêm relação com alteração/deterioração de produtos alimentícios. Entretanto, considerando o risco potencial de presença de aflatoxinas nestes produtos, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para verificar a incidência de fungos produtores de micotoxinas nos alimentos e rações^{4,10,13}. Outros trabalhos buscam relacionar as condições intrínsecas do produto alimentício que podem favorecer a multiplicação dos fungos que, conseqüentemente, são contaminados com substâncias metabólicas desses microorganismos^{3,5,13,14}.

Considerando a importância das aflatoxinas como risco à saúde e, considerando a incidência de fungos nos produtos alimentícios, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de verificar a presença de fungos aflatoxigênicos nas amostras de alimentos enviadas para análise microbiológica.

* Realizado na Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP e no Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Faculdade de Medicina da USP

** Do Instituto Adolfo Lutz

*** Da Faculdade de Medicina da USP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras — Foram analisadas 264 amostras de produtos alimentícios, incluindo condimentos, mel, pós para o preparo de alimentos, produtos amiláceos e outros. Estas amostras foram recebidas para análise microbiológica, procedentes dos serviços de Vigilância Sanitária (fiscalização e registro), licitação de compra de alimentos e de particulares.

Métodos

Tratamento das amostras — Para a pesquisa de fungos, preparou-se o homogêneo em liquidificador, utilizando-se 25 g (ou ml) da amostra em 225 ml de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1}). Após o preparo da diluição seriada, usando 1 ml da solução precedente em 9 ml do mesmo diluente, realizou-se a semeadura em placas pelo método em profundidade, vertendo 15-18 ml de ágar dextrose-batata fundido e acidificado (pH 3,5), após a distribuição de 1 ml das diluições. As placas foram incubadas a 22-25°C /5 dias. Procedeu-se a seleção das colônias para isolamento, através de critérios de aspecto e formação das mesmas⁷.

Isolamento e produção de toxinas — As colônias suspeitas de *Aspergillus* foram isoladas em 5 ml de caldo extrato de levedura acrescido de 20% de sacarose ("yeast extract medium - sucrose")², e incubadas a 22-25°C por 7-14 dias. Após esse período, os tubos contendo a cultura foram autoclavados e desprezou-se a massa do fungo. Utilizou-se o caldo para pesquisa das aflatoxinas, por cromatografia em camada delgada em sílica gel. Desenvolveu-se o cromatograma com mistura de clorofórmio-acetona-hexano 85:15:20). As manchas, fluorescentes sob luz ultravioleta (366 nm), correspondentes às aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂ da amostra foram comparadas com as dos padrões.

Identificação dos fungos — Os fungos foram identificados com base no aspecto macroscópico e microscópico.

Aspecto macroscópico (colônia gigante) — Cada cepa foi semeada na superfície da placa de Petri, contendo ágar-Czapeck.

As culturas foram mantidas a temperatura ambiente, por aproximadamente 14 dias. As colônias foram observadas no anverso, para verificar textura, tonalidade, presença de exsudato, tempo de crescimento e diâmetro, bem como a tonalidade do verso.

Aspecto microscópico — Com auxílio de microscópio estereoscópio foi feito o estudo da for-

ma e tonalidade das cabeças conidiais. A micro-morfologia foi obtida por cultivo em lâmina, não corada das cepas em ágar-Czapeck, segundo método de PORTO et alii⁹. (figura 1)

As cepas foram identificadas pelas características dos conidióforos, vesículas, presença ou ausência de tonalidade nos conídios, células pé, fiálides (unisseriadas ou bisseriadas ou ambas na mesma vesícula), além de mensuração das células utilizando-se as chaves de classificação de RAPER et alii¹¹, 1965 e de MCGINNIS⁸, 1980.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras analisadas e as cepas de *Aspergillus* isoladas são mostradas na tabela. Foram isoladas 269 cepas das 264 amostras analisadas, sendo identificados nove grupos do gênero *Aspergillus* e quatro espécies. As espécies são: *A. flavus*, Link, 1809 (pertence ao grupo flavus); *A. fumigatus*, Fresenius, 1863 (pertencente ao grupo fumigatus); *A. terricola*, Marchal, 1893 (pertencente ao grupo wentii) e *A. parasiticus*, Speare, 1912 (pertencente ao grupo flavus).

Das cepas isoladas, procedeu-se à cromatografia de 215 e, a pesquisa de aflatoxinas foi positiva em seis (2,79%) delas, assim distribuídas: uma (4,35%) dentre 23 de *A. flavus*, Link; duas (2,55%) dentre 75 do grupo flavus e três (2,91%) dentre 103 de *Aspergillus* sp.

As cepas produtoras de aflatoxinas foram isoladas de mel (duas amostras); de condimento (uma amostra); de produtos amiláceos (duas amostras) e de pó para o preparo de bebida láctea (uma amostra). Estas cepas foram capazes de produzir aflatoxinas B₁ e G₁, com exceção de *Aspergillus* sp isolada de produtos amiláceos, produtora só de B₁.

Estes resultados indicam que a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* é alta nos produtos alimentícios. Demonstram, também que estes fungos podem produzir e liberar aflatoxinas, na dependência de condições favoráveis que permitam o seu ciclo biológico completo, incluindo evidentemente, a fase de esporulação. A incidência de fungos aflatoxigênicos em produtos alimentícios entretanto, não mantém relação direta com a presença de aflatoxina B₁, considerando dados da literatura especializada no Brasil¹². Este estudo sugere a necessidade de maiores avaliações das condições de armazenamento/consevação, assim como das características intrínsecas do produto, que favorecem a produção de micotoxinas e afetam a vida dos fungos em cada tipo de produto alimentício, para verificar em quais etapas pode ocorrer a multiplicação e produção de micotoxinas.

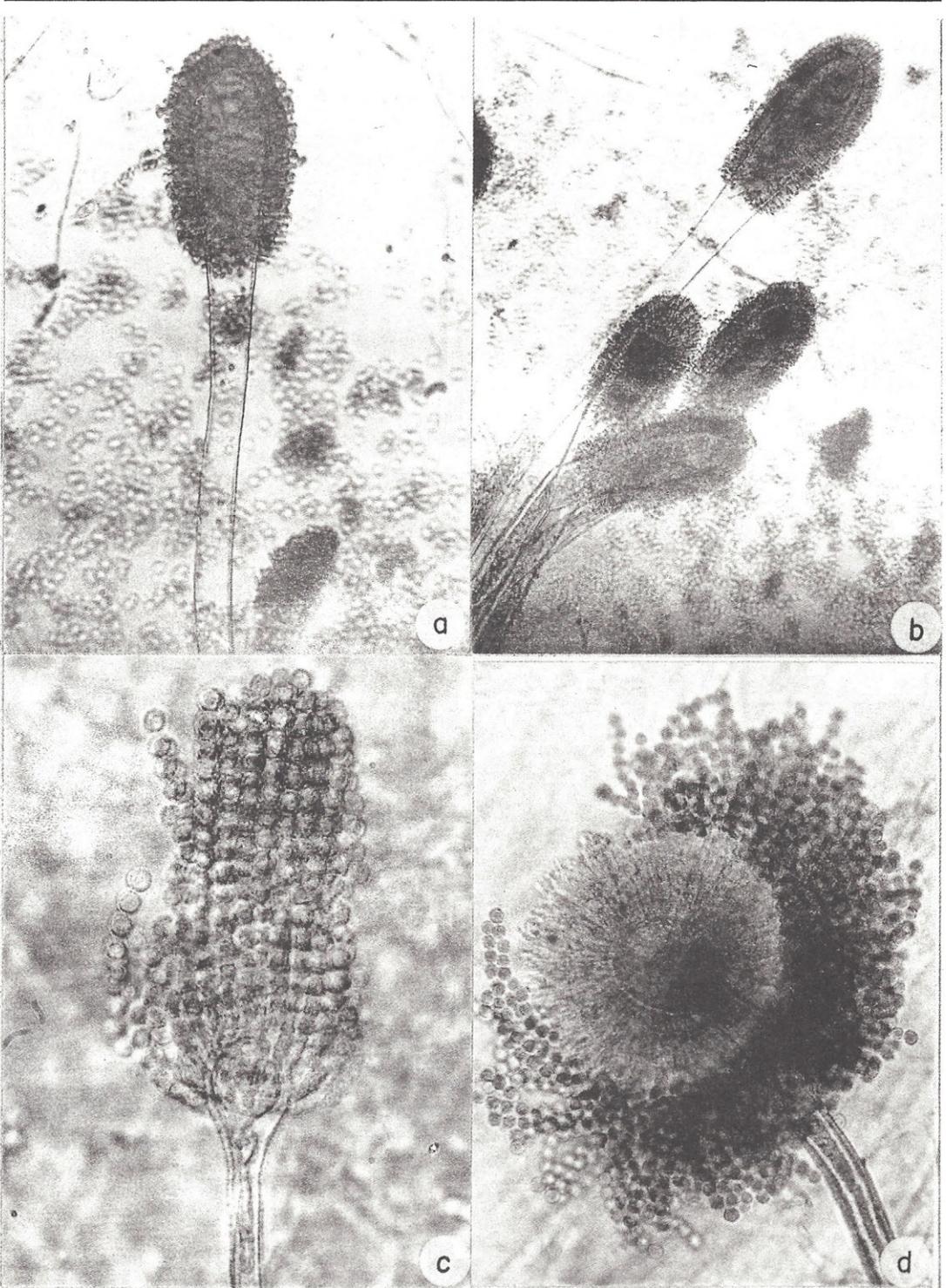


Fig. 1 — Aspectos micromorfológicos de *Aspergillus* spp. Cultivo em lâmina, não corado, em ágar-Czapek.
a,b) *Aspergillus* do grupo *clavatus* (100 e 63 X);
c) *Aspergillus* do grupo *flavus* (200 X);
d) *Aspergillus* do grupo *ochraceus* (160 X). Fotomicrografias; E. Porto.

TABELA 1

Identificação em grupos, gêneros e espécies de *Aspergillus* isolados de produtos alimentícios

Alimentos	Número de amostras	Grupos, gêneros e espécies de <i>Aspergillus</i>													Total de Cepas	
		(2)	(1)	(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(1)	Total de cepas cromatografadas	Total de cepas não cromatografadas
	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , Link	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , Fresenius	<i>Aspergillus cremeus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> , Speare	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Aspergillus terricola</i> , Marchal	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus terreus</i>			
Amiláceos	138	71	35	11	5	4	3	3	1	—	3	—	—	—	122	14
Condimentos	23	6	9	4	6	3	1	—	1	—	—	—	—	—	23	7
Mel	3	2	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—
Pós para o preparo dos alimentos	36	9	15	6	3	2	—	—	—	—	—	1	—	—	20	16
Produtos Diversos	64	15	16	3	8	10	2	1	2	3	—	2	1	1	47	17
Total	264	103	75	24	23	19	6	4	4	3	3	3	1	1	215	54
(1) grupo				(2) gênero					(3) especial							

Das espécies e grupos encontrados no presente trabalho, o produtor mais significativo de aflatoxina é o *A. flavus*, Link.

tores de outras micotoxinas e a avaliação da metodologia de isolamento dos fungos toxigênicos, para dimensionamento sanitário que existe em relação às micotoxinas nos produtos alimentícios.

CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que sejam realizados outros levantamentos para melhor avaliação da incidência destes fungos nos produtos alimentícios, assim como a utilização de outros substratos, além do "Yeast extract medium - sucrose", para verificar a produção de aflatoxinas, a pesquisa de fungos produ-

Agradecimentos

Agradecemos à Seção de Meios de Cultura pela elaboração dos respectivos meios e a Seção de Química Biológica pelas facilidades que permitiram a leitura dos cromatogramas, incluindo o fornecimento de padrão de aflatoxinas.

GELLI, D.S.; JAKABI, M. & PORTO, E. — Isolation of aflatoxigenic *Aspergillus* spp from food products - São Paulo, Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 319-323, 1990.

ABSTRACT: There were analysed 264 samples of food products, that included: natural flavours, honeys, powdered foods, starch products and others. From these samples, 269 strains of *Aspergillus* genera were isolated. The growth of 215 strains, on yeast extract broths supplemented with 20% of sucrose (YES), was tested by thin layer chromatography in silica gel for aflatoxin. The tests were positive in six samples (2,79%) respectively: in two samples of honey, two of starch products, one of natural flavour and one of powdered product for milk beverage. The aflatoxigenic strains were three (2,91%) of *Aspergillus* sp: two (2,66%) of flavus group and one (4,35%) of *Aspergillus flavus*, Link.

DESCRIPTORS: Food products; aflatoxigenic molds; aflatoxigenic *Aspergillus* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPBELL, T.C. & STOLOFF, L. — Implication of mycotoxin for human health. *J. agric. Food Chem.*, 22: 1006-1015, 1974.
2. DAVIS, N.D.; DIENER, V.L. & ELDRIGGE, D.V. — Production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14: 378-380, 1966.
3. FARAG, R.S.; EL-LEITHY, M.A.; BASYONY, A.E. & DAW, Z.Y. — Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium containing plant hormones, herbicides or insecticides. *J. Food Protect.*, 50: 1044-1047, 1987.
4. FRANK, H.K.; BETANCOURT, L. & EIROA, M.N.U. — A castanha-do-Pará II - Deterioração e condições de formação de aflatoxina. *Bol. SBCTA.*, 15: 367-378, 1981.
5. GOURAMA, H. & BULLERMAN, L.B. — Mycotoxin production by molds isolated from "greek-style" black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 81-90, 1988.
6. HAYES, A.W. — Mycotoxins — A real or potencial problem — Introduction. *J. Food Protect.*, 41: 373-374, 1978.
7. KOBURGER, J.A. & MARTH, E.H. — Yeasts and molds. In: SPECK, M.L. (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, APHA, 1984. c.17.
8. MCGINNIS, M.R. — *Aspergillus Micheli* ex Link, 1821. I. n: MCGINNIS, M.R. — *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York, Academic Press, 1980. p. 182-190.
9. PORTO, E.; TAKASHI, N.; HEINS E.M. & LACAZ, C.S. — Nuevo metodo para microcultivo de hongos. *Rev. argent. Micologia*, 4: 24-29, 1981.
10. PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; BARBIERE, W.; MEIRELES, M.C.A.; SABINO, M. & LIDA, S. — Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e esterigmatocistina) e correspondentes fungos mitoxigênicos em rações destinadas ao gado leiteiro. *Rev. Microbiol.* 19: 172-176, 1988.
11. RAPER, K.B. & FENNEL, D.L. — *The genus "Aspergillus"*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1965.
12. SABINO, M.; LAMARDO, I.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H. & GIANNATTASIO, C.M.P. — Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do país, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48: 81-85, 1988.
13. STOLOFF, L. — Toxigenic Fungi. In: SPECK, M.L. (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, APHA, 1984. c.41.
14. ZAIKA, L.L. & BUCHANAN, R.L. — Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *J. Food Protect.* 50: 691-708, 1987.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.

