



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

REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855

RIALA 5

VOLUME 1

NÚMERO 1/2

JUNHO/DEZEMBRO 1991



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

Endereço/Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 335 — Caixa Postal 7027
01000 — São Paulo, SP — Brasil

Editora Letras & Letras

Atendimento ao consumidor:
Av. Ceci, 1945 — Planalto Paulista
Fone: (011) 577-5746 — CEP 04065
Caixa Postal, 42070 — São Paulo, SP.

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 — 1900, 1-50
1991, 51(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 Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX, Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS, SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

ANÍSIO DE MOURA
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

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

EDITORA LETRAS & LETRAS

DIRETOR EDITORIAL
Carlos José Linardi
SUPERVISÃO GRÁFICA
Waldenes Ferreira Japyassú Filho
FOTOCOMPOSIÇÃO, PAGINAÇÃO E FILMES
Helvética Editorial Ltda.

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2):01-116, jun./dez., 1991.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos

- 700 Níveis residuais de óxido de etileno, etileno-cloridrato e etilenoglicol em sondas endotraqueais de borracha, em diferentes tipos de embalagens.
Levels of ethylene oxide, ethylene chlorhydrin and ethylene glycol residue in endotracheal tubes of rubber in different types packaging.
WATANABE, E. & BARRETTO, H.H.C. 1-6
- 701 Matérias estranhas leves e partículas metálicas em misturas para bebida láctea e mingau, destinadas à merenda escolar.
Light and heavy filth in mixtures for lacteal beverages and pap used for school programs.
SANTOS, M.C.; RODRIGUES, R.M.M.S. & ZAMBONI, C.Q. 7-10
- 702 Hortaliças brasileiras — Caracterização botânica e química das espécies: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché e *Amaranthus hybridus* L.
Brazilian vegetables — botanical and phyto-chemistry characterization of the species: Talinum paniculatum (Jacq.) Gaertn., Xanthosoma atrovirens C. Koch and Bouché and Amaranthus hybridus L.
JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & SAKUMA, A.M. 11-18
- 703 Fraudes e sujidades em condimentos comercializados na cidade de São Paulo.
Adulteration and filth in spices sold in São Paulo city.
ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ATUI, M.B. & SANTOS, M.C. 19-22
- 704 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. I — Composição da fauna flebotômica no município de São Roque, região de Sorocaba.
American Cutaneous Leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. I — Sandfly fauna composition of São Roque Country, Sorocaba region.
TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E.; CORRÊA, F.M.A.; MORAES, R.H.P.; VEIGA, R.M.O. & MARASSÁ, A.M. 23-30
- 705 Controle de qualidade interlaboratorial dos métodos utilizados em bioquímica clínica, na rede do Instituto Adolfo Lutz.
An interlaboratorial quality control of the utilized methods in clinical biochemistry, in the Adolfo Lutz Institute branch.
MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M.M.; STANCARI, R.C.A.; OLIVEIRA, R.M.; FERREIRA, R.M.M. & RUVIERI, V. 31-36

- 706 Níveis de nitritos, nitratos e sorbatos em queijos curados comercializados na cidade de São Paulo.
Nitrite, nitrate and sorbate levels in cured cheese sold in São Paulo city.
SILVEIRA, N.V.V.; YABIKU, H.Y.; DUARTE, M.; TAKAHASHI, M.Y. & CHICOUREL, E.L. 37-40
- 707 Uso de amostra controle na avaliação da reprodutibilidade de equipamentos semi-automatizados em hematologia laboratorial: uma proposta de controle de qualidade para laboratórios de saúde pública.
Using control sample for the evaluation of automatic equipment reproductibility in the hematology laboratory: a proposition for quality tibility eir the public heath laboratories.
MUNHOZ, M.A.G.; GUSHIKEN, E.Y.; PACHECO, N.R.; CAMPA, S.B.; KITAMURA, C. & AZEVEDO NETO, R.S. 41-45
- 708 Identificação histológica das principais compostas brasileiras de emprego medicinal.
Histological identification of main brazilian compositae of medicamental use.
JORGE, L.I.F.; PEREIRA, U. & SILVA, A.M. 47-51
- 709 Avaliação físico-química e microscópica de extrato, purê e polpa de tomate.
Tomato paste, tomato puree and tomato pulp: chemical and microscopical evaluation.
MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; AMARAL-MELLO, M.R.P.; ZAMBONI, C.Q. & SPITERI, N. 53-56
- 710 Diagnóstico rápido de vírus do grupo herpes por microscopia eletrônica: observações atípicas nas amostras de pacientes aids.
Rapid diagnostic of herpesvirus group by electron microscopy: atypical observations in the sample of patients with AIDS.
UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J. & JOAZEIRO, P.P. 57-62
- 711 Avaliação dos níveis de arsênio, chumbo e cádmio em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos no período de 1982 a 1989.
Evaluation of arsenic, lead and cadmiun levels in pigments and colours utilized in food packages, for the period 1982-1989.
GARRIDO, N.S.; PREGNOLATTO, N.P.; MURATA, L.T.F.; SILVA, M.R.; NUNES, M.C.D.; ANTUNES, J.L.F. & TIGLEA, P. 63-68
- 712 Estudo comparativo de métodos para determinação de pesticidas organoclorados.
Comparative study of methods to determination of chlorinated pesticide residues.
BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K. & LEMES, V.R.R. 69-74
- 713 Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e decosaheptaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha.
Determination of eicosapentaenoic (EPA) and docosaheptaenoic (DHA) acids in brazilian sardine (Sardinella brasiliensis) oil and encapsulated sardine oil supplements.
BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B.; TAVARES, M. & AUED-PIMENTEL, S. 75-81
- 714 Padronização do preparo de lisados hemoglobínicos estáveis para uso em laboratório de saúde pública.
Standardization of the stable lysates prepare for the use at the public health laboratory.
GUSHIKEN, E.Y.; MUNHOZ, M.A.G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V.M.C. & NIERO, L.I. 83-86
- 715 *Haemophilus influenzae* isolados de líquido cefalorraquidiano — frequência dos biotipos e sorotipos.
Haemophilus influenzae isolated from cerebrospinal fluid — frequency of biotypes and serotypes.
LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. 87-91

- 716 *Identification of Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus and human papilloma virus in irradiated uterine-cervix: critical analysis of potential problems in Papanicolaou smears routine.*
 Identificação de *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex vírus e papiloma vírus humano em colo uterino irradiado: análise crítica de um problema em potencial em esfregaços rotineiros de Papanicolaou.
 LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S. & OYAFUSO, M.S. 93-99
- 717 Anticorpos séricos IgA no diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansoni humana.
IgA antibodies in the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni.
 KANAMURA, H.Y.; SILVA, R.M.; RABELLO, A.L.T.; ROCHA, R.S. & KATZ, N. 101-104
- 718 Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações “naturais” empregadas em regimes de emagrecimento.
Detection of anorectics and benzodiazepines in galenicals used in treatment for obesity.
 AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & MARKMAN, B.E.O. 105-110

NÍVEIS RESIDUAIS DE ÓXIDO DE ETILENO, ETILENOCLORIDRINA E ETILENOGLICOL EM SONDAS ENDOTRAQUEAIS DE BORRACHA, EM DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS*

Esterlina WATANABE**
Heloisa H. C. BARRETTO***

RIALA6/700

WATANABE, E & BARRETTO, H. H. C. — Níveis Residuais de Óxido de Etileno, Etilenocloridrina e Etilenoglicol em sondas endotraqueais de borracha, em função dos tipos de embalagens utilizados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 1-6, 1991.

RESUMO: A análise dos teores residuais verificada em sondas endotraqueais de diversos diâmetros internos, em função dos tipos de embalagens utilizados, nas diversas posições na câmara de esterilização, revelou baixos teores residuais de óxido de etileno, em embalagem de papel grau cirúrgico verso polipropileno. Altos teores foram verificados em embalagens de filme de poliamida com poliamida. Não foram detectados teores significativos de etilenocloridrina e etilenoglicol.

DESCRIPTORIOS: Sondas endotraqueais de borracha; óxido de etileno, etilenocloridrina, etilenoglicol, resíduos em sondas de borracha; esterilização de sondas de borracha.

INTRODUÇÃO

As falhas na técnica de esterilização resultam muitas vezes de fatores ligados ao desconhecimento do manuseio de aparelhos, do uso de métodos incorretos de acondicionamento do material e dos princípios relacionados ao processo utilizado^{2,6,8,10,17}.

Os elevados índices de infecções nos hospitais acarretando complicações em pacientes, podem decorrer de falhas no processo de esterilização de materiais e equipamentos inadequadamente preparados.

Torna-se fundamental a identificação, prevenção e correção das falhas, através da implantação de medidas seguras principalmente quando alternativas de esterilização são introduzidas. Uma delas, amplamente empregada atualmente, é a do uso de óxido de etileno, pela sua propriedade bactericida.

O gás óxido de etileno é um agente químico bastante tóxico, capaz de destruir os microorganismos patogênicos das superfícies de determinados mate-

riais e equipamentos que não toleram esterilização a altas temperaturas^{1,8,12,15,16}.

Entretanto, este processo pode acarretar efeitos adversos à saúde, provenientes da quantidade de seus resíduos ou de seus sub-produtos, quando não processados dentro de padrões estabelecidos^{3,5,7,8,11,12,13,17,18}.

Para diminuir os riscos, os materiais esterilizados devem ser submetidos a uma efetiva aeração e acondicionados em embalagens apropriadas^{2,9,10} sendo que as mais freqüentemente usadas em hospitais são papéis, filmes plásticos e combinação de papel com filme plástico.

Algumas características importantes devem acompanhar as embalagens, para atender ao método de esterilização², como: permeabilidade, resistência, flexibilidade, ausência de componentes tóxicos na sua composição, facilidade no uso e integridade na selagem.

O limite de teores residuais nos materiais médico-cirúrgicos, encontra-se definido na Por-

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

** Do Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P.

*** Do Instituto Adolfo Lutz

taria do Ministério da Saúde segundo os valores adaptados aos padrões do FDA (Food and Drug Administration)⁴.

Outra preocupação verificada é a possível influência na localização dos materiais, quando colocados no interior da câmara para esterilização, mesmo que devidamente acondicionados.

Tais preocupações decorreram durante a experiência com o processo de esterilização utilizando o gás óxido de etileno, com intercorrências clínicas com os pacientes, caracterizados como reações alérgicas, semelhantes a queimaduras de segundo grau.

As embalagens empregadas rotineiramente vão desde o papel como que contém em sua composição, amido, substâncias tóxicas, ausência de resistência à flexão e propensa a rasgaduras, até filmes plásticos que não oferecem adequada permeabilidade, impedindo a liberação do resíduo de óxido de etileno e seus sub-produtos, etilenocloridrina e etilenoglicol².

Mediante os problemas enfrentados, o presente trabalho teve como objetivo verificar o teor residual de óxido de etileno, etilenocloridrina e etilenoglicol, utilizando sondas endotraqueais de diversos calibres, acondicionadas em diferentes tipos de embalagens, e em diversas posições no interior da autoclave, pretendendo dessa forma contribuir para a promoção de melhor nível de atendimento ao paciente, por meio de subsídios ao controle de qualidade do processo de esterilização utilizado.

MATERIAL E MÉTODO

Material

— Autoclave horizontal a óxido de etileno de ciclo automático com capacidade de 576 l, largura de 80 cm, altura de 60 cm e profundidade de 1,20 m, nas condições abaixo:

- pressão de trabalho de 1,100 kg/cm²
- pré-vácuo de 20 minutos
- tempo de exposição de 3,5 horas
- temperatura de 55°C
- umidade relativa de 40% a 50%
- mistura gasosa de 12% de óxido de etileno e 88% de Freon 12
- aeração prévia de 4 horas.

— Câmara aeradora de óxido de etileno com capacidade de 576 l, largura, de 80 cm, altura de 60 cm e profundidade de 1,32 m de ciclo automático, com termorregulador e temporizador de 12 horas, nas condições abaixo:

- temperatura de 52°C
- tempo de aeração de 12 horas.

— Embalagens

- a) Papel grau cirúrgico 80 g/ m², espessura de 0,090 mm, verso papel grau cirúrgico 60 g/m² e polietileno de 20 cm × 35 cm e espessura de 0,10 mm (papel grau cirúrgico × papel grau cirúrgico);
- b) papel grau cirúrgico 80 g/ m², espessura de 0,090 mm, verso poliéster/polietileno laminado 63 g/ m² de 20 cm × 35 cm e espessura de 0,062 mm (papel grau cirúrgico × polietileno);
- c) papel grau cirúrgico 80 g/ m², espessura de 0,090 mm, verso poliéster com polipropileno laminado 54 g/ m² de 20 cm × 35 cm e espessura de 0,052 mm (papel grau cirúrgico × polipropileno);
- d) filme de poliamida em ambas as faces de 18 cm × 35 cm e espessura de 0,045 mm (poliamida × poliamida).

— Sondas

As sondas endotraqueais utilizadas foram as de borracha providas de balões com as seguintes dimensões:

Comprimento (cm)	Diâmetro interno (mm)
13,5	2,5
21,5	4,5
30,0	7,5
30,0	8,5
30,0	9,5

- Cromatógrafo a gás Varian Aerograph 2700
- Termoseladora

MÉTODO

O trabalho foi realizado em um hospital geral governamental, cuja área de esterilização a óxido de etileno encontra-se dentro dos padrões mínimos exigidos. O estudo foi realizado com 120 amostras, utilizando uma sonda endotraqueal nova de cada calibre, para cada tipo de embalagem, colocadas em cada uma das posições internas da câmara de esterilização.

Fases do preparo do material:

- Limpeza — as sondas foram lavadas com sãbo neutro, escovadas manualmente em todas as suas superfícies interna e externa. Em seguida, enxaguadas em água corrente e colocadas em superfície limpa para escorrer a água em excesso. Após estes procedimentos, as sondas foram secadas com compressas limpas.
- Embalagem — as sondas foram acondicionadas individualmente nas embalagens propostas para o estudo, conforme descrição anterior.

- Selagem — realizado a termoselagem, tomando-se o cuidado de retirar o ar retido internamente, antes de fechá-los com o intuito de reduzir a danificação do invólucro.
- Identificação — cada invólucro foi identificado com o número do calibre da sonda, tipo de embalagem, posição interna na câmara esterilizadora e data de esterilização.
- Posicionamento — 3 sondas foram colocadas na prateleira superior e 3 na prateleira inferior, posicionadas de acordo com os cestos, na parte da frente, mediana e fundo.
- Esterilização — a esterilização processou-se com concentração de óxido de etileno de 450 mg/l, com exposição dos materiais durante 3,5 horas, considerado suficiente para que o agente esterilizante penetre completamente através das embalagens, após posicionado o termorregulador para 55°C, cuja operação é realizada 2 horas antes do funcionamento total do aparelho, para que haja uniformidade de aquecimento no momento da injeção do óxido de etileno. A umidificação do ciclo foi

realizada com 3 l de água destilada na bandeja localizada na parte inferior do aparelho. Após o ciclo de esterilização, houve evacuação do gás por exaustão à vácuo, com ar filtrado por um período de 4 horas. Em seguida, a porta da câmara de esterilização foi acionada, permanecendo semi-aberta por 15 minutos, após, transferidos para a câmara de aeração.

O encaminhamento dos materiais foi feito tomando-se o cuidado para que não ficassem expostas, isto é, foram empacotadas em conjunto dentro de campos de tecidos. O tempo gasto durante o trajeto foi, em média, de 10 minutos.

• Análise dos resíduos

O método utilizado e as condições analíticas foram descritos por Nogueira e colaboradores (14)

RESULTADOS

Os teores residuais de óxido de etileno (OET) nos 4 tipos de embalagens estudadas foram as seguintes, conforme demonstra a Tabela 1:

TABELA 1

Teores de óxido de etileno residual em ppm encontrados nas sondas endotraqueais embaladas em diferentes tipos de materiais, de acordo com as posições na câmara esterilizadora.

TIPO DE EMBALAGEM	DIÂMETRO DAS SONDAS (mm)	POSIÇÃO NA CÂMARA ESTERILIZADORA					
		SUPERIOR			INFERIOR		
		FRENTE	MEDIANA	FUNDO	FRENTE	MEDIANA	FUNDO
Papel	2,5	< 1,0	4,6	< 1,0	< 1,0	113,0	13,9
	4,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	10,0	< 1,0
	7,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	8,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	9,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	34,0	< 1,0
Polietileno	2,5	< 1,0	15,	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	4,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	7,5	70,0	16,1	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	8,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	9,5	44,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Polipropileno	2,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	20,0	< 1,0	< 1,0
	4,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	17,0	< 1,0	< 1,0
	7,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	8,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	9,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Poliamida	2,5	381,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	27,9	< 1,0
	4,5	14,0	< 1,0	< 1,0	12,7	6,0	251,4
	7,5	1.039,0	16,0	21,2	< 1,0	16,5	199,8
Poliamida	8,5	5,2	13,4	45,7	28,8	15,3	< 1,0
	9,5	147,6	31,8	7,7	31,8	15,7	16,0

- Embalagem de papel grau cirúrgico verso papel grau cirúrgico — as sondas endotraqueais de diâmetro 2,5 mm apresentaram resíduos de óxido de etileno tanto na posição superior como na posição inferior da câmara esterilizadora. As de diâmetros 4,5 mm e 9,5 mm apresentaram teores residuais apenas na posição inferior mediana.
- Embalagem de papel grau cirúrgico verso polietileno — teores residuais de óxido de etileno foram observados nas sondas endotraqueais de diâmetros 2,5 mm, 7,5 mm e 9,5 mm. Neste tipo de embalagem, foi verificada a presença de resíduos apenas nas posições superior frente e mediana da câmara esterilizadora.
- Embalagem de papel grau cirúrgico verso polipropileno — na utilização deste tipo de embalagem, verificou-se níveis residuais de óxido de etileno apenas nas sondas endotraqueais de diâmetro 2,5 mm e 4,5 mm. Com relação à localização na câmara de esterilização, observou-se a presença de resíduos somente na posição inferior frente.
- Embalagem de poliamida verso poliamida — foram encontrados níveis residuais de óxido de etileno em 22 amostras de sondas endotraqueais empacotadas neste tipo de embalagem. Os maiores teores foram constatados nas sondas endotraqueais de diâmetro 2,5 mm, 4,5 mm e 7,5 mm. Apenas um valor elevado de

teor residual de óxido de etileno foi observado na posição inferior da câmara esterilizadora, enquanto que na posição superior, detectaram-se dois valores elevados de níveis residuais. Destaca-se ainda que das 30 amostras estudadas, apenas 8 não apresentaram achados importantes (< 1,0 ppm).

Os valores residuais de óxido de etileno encontrados nas embalagens estudadas, com exceção da embalagem de poliamida verso poliamida, situam-se dentro dos limites estabelecidos pela Portaria vigente⁽⁴⁾.

- Distribuição dos Indicadores de resíduos de Óxido de Etileno (OET), segundo as Embalagens Estudadas

Com relação a presença de teores residuais de óxido de etileno nas embalagens estudadas, com exceção do filme de poliamida, pode-se estabelecer uma ordem seqüencial de uso da embalagens que apresentaram resultados superiores a 1,0 ppm (partes por milhão), nas sondas endotraqueais. Em primeiro lugar está a embalagem de papel grau cirúrgico verso polipropileno; em em segundo, papel grau cirúrgico verso polietileno (Tabela 2).

A análise desta distribuição, no âmbito deste estudo, permite supor melhor desempenho da embalagem de papel grau cirúrgico verso polipropileno, em relação aos demais, definindo a sua utilização como invólucro de materiais a serem esterilizados a óxido de etileno.

Tabela 2

Distribuição dos indicadores de resíduos de óxido de etileno em ppm* obtidos neste estudo, segundo embalagens.

EMBALAGEM	INDICADOR RESIDUAL		
	1,0	1,0-249	250
Grau Cirúrgico / Grau Cirúrgico	25	5	—
Grau Cirúrgico / Polietileno	26	4	—
Grau Cirúrgico / Polipropileno	28	2	—
Poliamida / Poliamida	8	19	3

* partes por milhão.

- Teores Residuais de Etilenocloridrina (ETC) e Etilenoglicol (ETG)

Os resíduos de etilenocloridrina (ETC) e etilenoglicol (ETG) encontrados nas amostras não apresentaram resultados considerados significativos, mantendo-se sem variação com valores abaixo de 0,01 ppm (partes por milhão) em todas as embalagens utilizadas. Estes valores correspondem a precisão nas medidas, resultantes do nível de sensibilidade do cromatógrafo, isto é, a menor dosagem

possível de detecção. Os valores encontrados foram independentes das posições no interior da câmara esterilizadora.

DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido realizados em que algumas embalagens são rejeitadas e outras aceitas, baseadas na permeabilidade dos materiais ao óxido de etileno^{2,6,10}. A importância da permeabilidade

da embalagem ao gás óxido de etileno, objeto deste estudo, está na retenção de teores residuais encontrados após a esterilização de materiais.

Dentre as 4 embalagens estudadas, cabe ressaltar que o papel grau cirúrgico verso polietileno e papel grau cirúrgico verso polipropileno, são consideradas as mais indicadas para embalar materiais.

A face que corresponde ao filme plástico na embalagem tem a finalidade de proporcionar a visualização do seu conteúdo, enquanto que a parte que promoverá a permeabilidade, corresponde à face de papel². O resultado esperado quando da utilização da embalagem papel grau cirúrgico verso papel grau cirúrgico, seria a ausência residuais de óxido de etileno, uma vez que ela propiciaria melhores condições de permeabilidade ao agente esterilizante. Entretanto, esta embalagem apresenta na sua constituição interna de uma de suas faces, uma película de filme de polietileno aplicado sob o processo de extrusão, cuja finalidade é a obtenção de uma perfeita termoselagem, podendo ser interpretada como provável interveniente.

Os teores residuais de óxido de etileno verificados nas sondas endotraqueais embaladas em poliamida verso poliamida foram os únicos classificados acima dos parâmetros estabelecidos pelos órgãos oficiais nacionais e internacionais, fato que vem confirmar as restrições ao seu uso como embalagem de materiais a serem esterilizados em óxido de etileno.

Com relação à localização dos materiais na câmara de esterilização, observou-se teores residuais de óxido de etileno na posição inferior mediana e fundo, com a utilização da embalagem papel grau cirúrgico verso papel grau cirúrgico. A presença de teores residuais de óxido de etileno na posição inferior da câmara esterilizadora poderia ser atribuída à quantidade recebida do agente esterilizante pela proximidade de sua localização¹⁴. No entanto, pode-se observar que nas sondas endotraqueais de

diâmetros 7,5 mm e 8,5 mm, os teores residuais de óxido de etileno foram inferiores a 1,0 ppm (partes por milhão), merecendo uma forma mais apurada em estudos futuros.

CONCLUSÕES

- Relacionados à Embalagens:
 - a) Níveis residuais importantes de óxido de etileno (250 ppm) foram encontrados em sondas endotraqueais embaladas em poliamida verso poliamida;
 - b) as embalagens de papel grau cirúrgico verso papel grau cirúrgico, papel grau cirúrgico verso polietileno e papel grau cirúrgico verso polipropileno apresentaram teores residuais de óxido de etileno, dentro dos parâmetros estabelecidos pelos órgãos oficiais (250 ppm);
 - c) não foram encontrados teores residuais importantes de etilenocloridrina (ETC) e etilenoglicol (ETG) nas sondas endotraqueais estudadas.
- Relacionadas aos diâmetros internos das sondas endotraqueais:

Foram verificados teores residuais importantes de óxido de etileno (250 ppm) em sondas endotraqueais de diâmetros internos de 2,5 mm, 4,5 mm e 7,5 mm embaladas com invólucros de poliamida verso poliamida. Não foi possível caracterizar a influência dos calibres das sondas endotraqueais, em relação à impregnação por óxido de etileno.

- Relacionadas à posição do material no interior da câmara de esterilização:

Foram encontrados teores residuais importantes de óxido de etileno, tanto na posição superior como na inferior da câmara esterilizadora, apenas nas sondas endotraqueais embaladas em poliamida verso poliamida.

RIALA6/700

WATANABE, E & BARRETO, H. H. C. — Levels of ethylene oxide, ethylene chloridrin and ethylene glycol residue in endotracheal tubes of rubber in different types packaging. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2): 1-6, 1991.

ABSTRACT: A marked difference was found between packaging with polypropylene film on one side and surgical-grade paper on the other side, and polyamide packaging on both sides. The retained was lower in endotracheal tubes of rubber wrapped with polypropylene film packaging on one side and surgical-grade paper on the other side. The level determined was not significant in endotracheal tubes of ethylene chlorhydrin an ethylene glycol residual, as with using packaging of surgical-grade paper-plastic combinations with polypropylene, polypropylene and polyamide films.

DESCRIPTORS: endotracheal tubes of rubber; ethylene oxide, ethylene chloridrin, ethylene glycol residues in tubes of rubber; sterilization of tubes of rubber.

WATANABE, E & BARRETTO, H. H. C. — Níveis Residuais de Óxido de Etileno, Etilenocloridrina e Etilenoglicol em sondas endotraqueais de borracha, em função dos tipos de embalagens utilizados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2): 1-6, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTEMEIER, W. A. — *Manual de controle de infecção em pacientes cirúrgicos*. São Paulo, Manole, 1978, p. 308-10.
2. AMERICAN HOSPITAL ASSOCIATION. — *Ethylene Oxide use in hospital a manual for health care personnel*. Chicago, American Society for Hospital Central Service Personnel, 1982, 162 p.
3. BOGDANSKY, S. & LEHN, P. J. — Effects of γ — Irradiation on 2 — Chloroethanol formation in ethylene oxide - sterilized polyvinyl chloride. *J. Pharm. Sci.* Washington, 63(5): 105-6, 1974.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Portaria número 982 de 29 de dez. 1989. *Diário Oficial*, Brasília, 03 de janeiro de 1990. Seção I, p. 2356 Estabelece normas técnicas para o uso, o manuseio, o cadastro, as instalações e as condições, limites de operações e de segurança do ambiente e da pessoa, em unidade de esterilização de materiais, pelo processo do gás de óxido de etileno puro ou de suas misturas com gás inerte liquefeito.
5. CAPUTO, R. A. & ODLAUG, T. E. — Sterilization with ethylene oxide and other gases. In: BLOCK, S. S. *Desinfection sterilization and preservation*. 3rd. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983, cap. 2, p. 47-64.
6. DELATTRE, L. et alii. — Study of the desorption of ethylene oxide from different plastic materials sterilized with the same gas. *J. Pharm. Belg.* Bruxelles, 40(3): 163-7, 1985.
7. ENGLEJ JR., F. B. — Pasado presente y futuro de la sterilization por oxido de etileno. *todo Hosp.* Barcelona, (29): 29-38, 1986.
8. GARDNER, J. F. & PEEL, M. M. — Sterilization by gaseous chemicals. In: *Introduction to sterilization and desinfection*. London, Churchill livingstone, 1986. cap. 7, 83-94.
9. GUNTHER, D. A. — Permeability of materials to ethylene oxide. *Bull. Parenter. Drug. Assoc.* Philadelphia, 30(3): 152-6, 1976.
10. ——— — Staley of ethylene oxide gas residuals: part II. *Am. J. Hosp. Pharm.* Washington, 31(7): 684-6, 1974.
11. HANSEN J. P. et alii. — Normal sister chromatid exchange levels in hospital sterilization employees exposed to ethylene oxide. *J. Occup. Med.* Chicago, 26(1): 20-32, 1984.
12. LACOME, M; LE MOAN, G. & CHAIGNEAU, M. Retention of ethylene oxide by polyvinyl chloride and polyethylene materials after sterilization. Washington, D. C., National Aeronautics and Space Administration, 1976, 11 p.
13. MATSUMOTO, T. et alii. Safe standard of aeration for ethylene oxide sterilized supplies. *Arch. Surg.* Chicago, 96(1): 464-70, 1968.
14. NOGUEIRA, M. H. et alii. Resíduos tóxicos em materiais médicos cirúrgicos esterilizados com óxido de etileno: verificação do nível de impregnação após reesterilizações. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo 49(1), 27-34, 1989.
15. *ÓXIDO de etileno como agente esterilizante*. São Paulo, Ethicon, 1981, 34 p.
16. *ÓXIDO de etileno: revisão toxicológica*. São Paulo, Ethicon 1983, 39 p.
17. PERKINS, J. J. — *Sterilization of medical and surgical supplies with ethylene oxide*. In: *Principles and methods of, sterilization in health sciences*. 2 nd. ed. Springfield, Charles C. Thomas, 1983, cap. 19 p. 501-30.
18. ROBERTS, R. B. & RENDELL — BAKER, L. — Aeration after ethylene oxide sterilization. *Anaesthesia*. London, 27(3): 278-82, 1972.

Recebido para publicação em 14 de fevereiro de 1990.

MATÉRIAS ESTRANHAS LEVES E PARTÍCULAS METÁLICAS EM MISTURAS PARA BEBIDA LÁCTEA E MINGAU, DESTINADAS À MERENDA ESCOLAR*

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

RIALA6/701

SANTOS, M. C.; RODRIGUES, R. M. M. S. & ZAMBONI, C. Q. — Matérias estranhas leves e partículas metálicas em misturas para bebida láctea e mingau, destinadas à Merenda Escolar. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2): 7-10, 1991.

RESUMO: Para avaliar as condições higiênicas de alimentos destinados à Merenda Escolar, quanto à presença de matérias estranhas leves (insetos, seus fragmentos e larvas) e de partículas metálicas, foram analisadas 50 amostras de misturas para o preparo de bebida láctea e 50 amostras de misturas para o preparo do mingau. Para a pesquisa de matérias estranhas leves, utilizou-se o método padronizado pela A.O.A.C., com modificações. Encontrou-se fragmentos de insetos em 66% das amostras de misturas para bebida láctea e em 62% das amostras de mingau. Não foram encontrados insetos e larvas nas amostras analisadas. Para pesquisa de partículas metálicas desenvolveu-se um método onde a amostra dissolvida em água é agitada com uma barra magnética que atrai as partículas e possibilita sua contagem. Verificou-se que 30% das amostras de misturas para bebida láctea e 44% das amostras de misturas para mingau continham partículas metálicas.

DESCRITORES: mistura para bebida láctea, mistura para mingau, Merenda Escolar, matérias estranhas leves, partículas metálicas, detecção microscópica.

INTRODUÇÃO

O Programa da Merenda Escolar objetiva a alimentação de crianças de 1º grau, da Rede de Ensino Oficial, durante o ano letivo e férias escolares^{6,9}. Os produtos destinados a esse fim devem ser de boa qualidade, não somente em valor nutricional mas também no aspecto de higiene.

Dentro da classe de alimentos destinados à Merenda Escolar estão os pós para o preparo de alimentos⁸, como as misturas para o preparo de bebida láctea e de mingau.

Matérias estranhas leves, como insetos, larvas, fragmentos de insetos e de larvas, ácaros e pêlos de roedor, podem ser encontradas como contaminantes dessas misturas, podendo ser incorporadas às mesmas tanto pelo uso de matérias primas contaminadas, como pelas más condições higiênicas,

durante o processamento ou pela estocagem prolongada em condições inadequadas.

Em trabalho anterior¹², verificou-se a presença de fragmentos de insetos, pêlos de roedor e ácaros em produtos de cacau, o que poderia contaminar as misturas para bebida láctea e mingau sabor chocolate. Tem-se constatado a contaminação por fragmentos de insetos e ácaros em amostras de amido de milho, matéria prima desses produtos.

As partículas metálicas (ferromagnéticas) podem estar presentes nos alimentos devido à contaminação durante a produção e o processamento dos mesmos. A presença dessas partículas pode ocorrer, principalmente, quando se tem contato do alimento com peneiras, pulverizadores, encanamentos velhos e enferrujados e maquinarias gastas ou com ajuste mal feito de juntas, ou mesmo, com parafusos soltos¹⁰. Dificilmente se consegue evitar as

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

contaminações durante as operações normais de moagem, porém aquelas ocorridas devido ao desgaste das maquinarias ou ao controle inadequado dos equipamentos podem ser controladas.

Esses achados, quanto à presença de matérias estranhas leves e a possibilidade de ocorrência de partículas metálicas, em produtos que podem ser matéria prima de misturas para o preparo de bebida láctea e de mingau, a necessidade de ter um padrão de qualidade em alimentos destinados à Merenda Escolar da Rede Oficial do Estado de São Paulo aliados à escassez de literatura, quanto às condições higiênicas desses produtos, requisitaram o planejamento deste trabalho.

Para o controle das condições higiênicas das amostras foram aprimoradas técnicas, já utilizadas para outros produtos, de extração de matérias estranhas leves e de extração e determinação de partículas metálicas e verificado o nível de incidência dessas matérias estranhas nesses alimentos, visando também possíveis alterações na legislação em vigor⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 50 amostras de misturas para o preparo de bebida láctea e 50 de misturas para o preparo de mingau, ambas de diversos sabores, enviadas para análise pelas indústrias, ao Instituto Adolfo Lutz, durante o ano de 1989.

Métodos

1 — Pesquisa de matérias estranhas leves

Foi utilizado o método da tamisação para sujidades leves em amidos da Association of Official Analytical Chemists⁵ com modificações que permitiram o seu aprimoramento, como menores quantidades de amostra e de águas e a utilização do frasco de Wildman, para uma melhor extração das matérias estranhas leves.

Procedimento: Pesar 100 g de amostra em um béquer de 1000 ml e adicionar 600 ml de água filtrada. Misturar com bastão de vidro e passar a mistura por tamis USBS 230, lavando com jatos de água à 37°C, para eliminar o amido. Em amostras com excessivo resíduo de elementos histológicos no tamis, transferir o resíduo para o béquer e adicionar HCl (1 + 9), aquecer, passar a mistura para o frasco armadilha de Wildman, juntar 15 ml de n-heptano e completar o volume do frasco com água quente (50-70°C); agitar ocasionalmente durante 20 minutos e extrair o material para o béquer, após 10 minutos de repouso. Adicionar 15 ml de n-heptano, completar novamente o volume do frasco com água quente, agitar, deixar em repouso por 10 minutos e extrair novamente o material. Filtrar

à vácuo sobre papel de filtro e examinar ao microscópio estereoscópico, aumento de 20 vezes.

2 — Pesquisa de partículas metálicas

A - Contagem

O método para extração das partículas metálicas baseou-se no princípio da atração magnética⁷. Após, procedeu-se a contagem.

Procedimento: Pesar 50g de amostra em um béquer de 600 ml e adicionar 400 ml de água filtrada. Agitar com barra magnética por 15 minutos. Retirar a barra magnética do béquer com a pinça (se necessário, lavar ligeiramente a barra com água para não ficar resíduo da amostra retido na mesma) e deixar secar. Examinar ao microscópio estereoscópico (aumento de 20 vezes) e contar as partículas metálicas aderidas à barra. Lavar a barra magnética, e repetir a agitação, para recuperar possíveis partículas metálicas remanescentes, após a primeira agitação e proceder à contagem.

B — Medida do tamanho

Para medir o tamanho das partículas foi utilizado o método descrito por Wallis¹¹.

RESULTADOS

Na análise das 100 amostras de misturas para o preparo de bebida láctea e de mingau foram encontrados, como matérias estranhas leves, somente fragmentos de insetos. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos, com faixas de incidência, em intervalos de 10, de matérias estranhas leves.

A Tabela 2 mostra o número e a porcentagem de amostras contendo ou não partículas metálicas, com faixas de incidência, em intervalos de 20 para a quantidade, e intervalos mínimo e máximo, para o tamanho. Os resultados de partículas metálicas obtidos em 50g de amostra foram calculados para 100g.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No método de tamisação para pesquisa de matéria estranha leve para amidos⁵, faz-se uma hidrólise posterior com HCl, para eliminar o excesso de material retido no tamis.

Em alguns tipos de misturas para o preparo de mingau (como mingau de cereais), só a hidrólise não foi suficiente, permanecendo muito resíduo retido no tamis (elementos histológicos do cereal). Para essas misturas utilizou-se o frasco armadilha de Wildman com n-heptano, como líquido de flutuação^{1,2,3}, para extração e filtração do material hidrolizado, o que permitiu a identificação da matéria estranha leve presente na amostra.

TABELA 1

Matéria estranha leve em misturas para o preparo de bebida láctea e de mingau (número/100g)

Matéria estranha leve tipo	incidência	Bebida Láctea		Mingau	
		nº	%	nº	%
	0	17	34,0	19	38,0
Fragmentos de insetos	1 - 10	29	58,0	22	44,0
	11 - 20	2	4,0	5	10,0
	21 - 30	2	4,0	3	6,0
	31 - 40	0	0,0	1	2,0
Total		50		50	
Larvas	0	50	100,0	50	100,0
Total		50		50	
Insetos	0	50	100,0	50	100,0
Total	0	50		50	

TABELA 2

Partículas metálicas em misturas para o preparo de bebida láctea e de mingau (número/100g)

Partículas metálicas		Bebida láctea		Mingau	
incidência	tamanho (mm)	nº	%	nº	%
0	—	35	70,0	28	56,0
1 - 20	0,15 - 0,30	4	8,0	11	22,0
21 - 40	0,15 - 0,30	4	8,0	5	10,0
41 - 60	0,15 - 0,30	0	0,0	4	8,0
> 300	0,01 - 0,10	7	14,0	2	4,0
Total		50		50	

Na análise de misturas para o preparo de bebida láctea, a hidrólise não foi necessária pois a pequena quantidade de amido, que é apenas um dos componentes da mistura⁸, não deixa resíduo no tamis.

De acordo com a Tabela 1, 34% das amostras de misturas para bebida láctea estavam isentas de matérias estranhas leves, enquanto que as demais, 66%, continham somente fragmentos de insetos e em número inferior a 30.

Quanto às misturas para mingau, 38% das amostras estavam isentas de matérias estranhas leves, enquanto que 62% continham fragmentos de insetos e em número inferior a 40 (Tabela 1).

De acordo com a legislação vigente⁸, deve haver ausência de sujidades, parasitos e larvas em "pós para o preparo de alimentos". Não havendo limite de tolerância para fragmentos de insetos, 66% das amostras de misturas para bebida láctea e 62% de misturas para mingau foram consideradas em condições higiênicas insatisfatórias. Sugere-se uma modificação na legislação, quanto à fragmentos de in-

setos, estabelecendo-se um limite de tolerância de até 20 fragmentos em 100g de amostra.

Para a pesquisa de partículas metálicas, não foi possível utilizar o método preconizado pela A.O.A.C.⁴, que utiliza mistura de clorofórmio e tetracloreto de carbono, como meio de sedimentação, para separar as partículas metálicas do produto, pois o açúcar presente nas misturas de bebida láctea e mingau sedimenta juntamente com as partículas metálicas, impedindo a visualização das mesmas, após a filtração do material sedimentado no béquer.

Buscando solucionar a separação das partículas metálicas desse tipo de produto, modificou-se uma técnica já existente, de forma que, após dispersão da amostra, fez-se a agitação com barra magnética. As partículas metálicas presentes no alimento foram atraídas, podendo ser contadas com o auxílio do microscópio estereoscópico.

Utilizou-se água para dispersão das amostras, não sendo necessários o uso do clorofórmio e me-

tanol e da barra magnética dentro do tubo de vidro⁷, uma vez que, a atração magnética foi suficiente para a separação das partículas metálicas do meio e posterior determinação. Teve-se o cuidado de não usar materiais metálicos, como pinças, para manejar a barra magnética, pois poderia haver atração de partículas metálicas da barra para a pinça, interferindo no resultado.

Pela Tabela 2 verifica-se que a porcentagem de amostras isentas de partículas metálicas foi de 70% para a mistura para bebida láctea e de 56% para mingau.

Das amostras de mistura para bebida láctea que continham partículas metálicas, 16% apresentaram de 1 a 40 partículas metálicas em 100g de amostra e 14% acima de 300 partículas (Tabela 2).

Nas misturas para mingau, 40% continham de 1 a 40 partículas e 4% das amostras apresentaram acima de 300 partículas por 100g de amostra (Tabela 2).

Verificou-se que o tamanho das partículas nas amostras que continham de 1 a 60 partículas metálicas variou entre 0,15 e 0,30mm e nas que continham acima de 300 partículas, o tamanho ficou entre 0,01 e 0,10 mm (Tabela 2), ou seja, quanto maior o número de partículas metálicas atraídas, menor o tamanho.

Como bebidas lácteas e mingaus são produtos finais da mistura de pós, como açúcar, amido e chocolate, a presença de partículas metálicas nesses alimentos pode ocorrer pelo uso de matérias primas mal elaboradas. Sugere-se, portanto, a continuação da pesquisa de partículas metálicas nessas matérias primas, antes de propor alterações na legislação vigente.

Os métodos utilizados para pesquisa de matérias estranhas leves e de partículas metálicas mostraram-se eficientes, rápidos e de fácil execução, sendo adequados na continuidade da pesquisa.

RIALA6/701

SANTOS, M. C.; RODRIGUES, R. M. M. S. & ZAMBONI, C.Q. — Light and heavy filth in mixtures for lacteals beverages and pap used for school programs. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2): 7-10, 1991.

ABSTRACT: 50 samples of lacteals beverages and 50 of pap used in the official program of school meal were analyzed for light and heavy filth. For the light filth detection was utilized the method of Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. with modifications. It was concluded that 66,0% of samples of lacteals beverages and 62,0% of pap had insect fragments. It was developed a method for metallic particles count. Ferromagnetic particles were detected in 30,0% samples of lacteals beverages and 44,0% samples of pap.

DESCRIPTORS: lacteals beverages, pap, school meal, light filth, ferromagnetic particles, microscopic detection.

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. 889 (Tecn. 44.003 1).
2. Id., *ibid.*, p. 890 (Tecn. 44.004c)
3. Id., *ibid.*, p. 890 (Tecn. 44.005b)
4. Id., *ibid.*, p. 899 (Tecn. 44.049)
5. Id., *ibid.*, p. 912 (Tecn. 44.062)
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Decreto n° 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.
7. CUNNINGHAM, H.M. & O. BRIEN, R. — Ferromagnetic particles in foods. *J. Food Sci.*, Chicago, 37: 572-3, 1972.
8. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. — Decreto n° 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 37 (NTA 79). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
9. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. — Decreto n° 22.379 de 19 de junho de 1984. *Diário Oficial*, São Paulo, 20 jun. 1984. p. 1. Dispõe sobre a municipalização da merenda escolar, regulamentando a Lei n° 4.021 de 22 de maio de 1984.
10. SELBY, J.W. apud CUNNINGHAM, E.M. (7).
11. WALLIS, T.E. — *Microscopia analítica: sus fines, y metodos in relación a los alimentos, agua, especias y medicamentos*; trad. por J.G. Berenguer, Zaragoza, Acribia, 1968. p. 223-5.
12. — ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ATUI, M.B. & BATISTIC, M.A. — Sujidades e fraudes em chocolates. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2): 37-41, 1988.

Recebido para publicação em 24 de maio de 1990.

HORTALIÇAS BRASILEIRAS — CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E QUÍMICA DAS ESPÉCIES: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché e *Amaranthus hybridus* L.*

Luzia Ilza Ferreira JORGE**
Vicente de Oliveira FERRO***
Alice L. SAKUMA**

RIALA6/702

JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O. & SAKUMA, A. L. — Hortaliças brasileiras — caracterização botânica e química das espécies: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché e *Amaranthus hybridus* L.. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 11-18, 1991.

RESUMO: São descritas as principais características botânicas e fito-químicas de três espécies de hortaliças nativas com o objetivo de identificá-las, principalmente quando apresentadas sob formas industrializadas, fortemente trituradas (sopas, produtos liofilizados, etc). As descrições botânicas são acompanhadas de desenhos.

DESCRIPTORIOS: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché, *Amaranthus hybridus* L., língua-de-vaca, taioba, caruru.

INTRODUÇÃO

As hortaliças empregadas na alimentação da população urbana da região sul do Brasil são constituídas quase exclusivamente de plantas estrangeiras aclimadas no nosso país. Podemos agrupá-las em três famílias, basicamente: umbelíferas (aipo, coentro, erva-doce, cenoura, etc), crucíferas (agrião, couve, repolho, acelga, etc) e compostas (alface, almeirão, chicória, etc).

Este trabalho visa o reconhecimento e a promoção de algumas de nossas mais populares e saborosas hortaliças indígenas, e que, no entanto, não são cultivadas e/ou comercializadas nem mesmo em nosso próprio país. Na condição em que se encontram, podem vir a serem extintas em curto espaço de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bou-

ché e *Amaranthus hybridus* L. foram coletadas em terrenos baldios do bairro de Santo Amaro, nesta capital. A identificação botânica das mesmas ficou a cargo da pesquisadora Lúcia Rossi, do Instituto de Botânica, São Paulo.

Os cortes histológicos foram executados a mão livre. Foram empregados corantes histológicos usuais em estudos anatômicos. Os desenhos foram executados sob projeção de câmara clara. A escala foi determinada com lâmina micrométrica.

A triagem fito-química de princípios ativos naturais foi procedida através de reações de coloração e precipitação após extrações com solventes orgânicos, segundo técnicas descritas nos compêndios de farmacognosia.

Análise mineral

Preparação da amostra — pesar com exatidão cerca de 10g da amostra, previamente seca e pulverizada, em cápsula de porcelana. Incinerar e levar à mufla a 400° C. Dissolver as cinzas esbran-

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. — VII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos — Centro de Conv. Rebouças

** Do Instituto Adolfo Lutz

*** Da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP

quiçadas com 5ml de ácido nítrico concentrado p.a. e aquecer em chapa elétrica para eliminar o excesso de ácido. Transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 50 ml e completar o volume com água destilada. Filtrar e analisar os minerais no filtrado.

Métodos — Os métodos empregados para a determinação de ferro e cálcio encontram-se descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁷. Para a determinação de magnésio, foi utilizado o mesmo método que para o cálcio, porém, a solução-amostra foi previamente neutralizada com hidróxido de sódio até pH 10.

Determinação de manganês

Reagentes

Solução-padrão estoque de manganês, 1.000 mg/l, preparada a partir de solução titrisol Merck.

Soluções padrão de trabalho de manganês: 0,2 mg/l; 0,5 mg/l e 1,0 mg/l; preparadas a partir da solução-padrão estoque.

Equipamento

Espectrofotômetro de absorção atômica, mod. 460, Perkin Elmer, equipado com corretor de deutério.

Condições experimentais: chama ar/acetileno, fenda 0,2 nm e comprimento de onda 279,5 nm.

Procedimento: diluir a solução amostra 50 ou 100 vezes, em função da concentração de manganês presente, e efetuar a leitura no espectrofotômetro de absorção atômica. Fazer as leituras das soluções-padrão de manganês e do branco.

RESULTADOS

Exame morfológico e estrutural (botânico)

1. *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.

A espécie *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. apresenta como sinonímia científica mais freqüente a denominação *Talinum patens* (L.) Willd.

Popularmente é conhecida sob diversas denominações em função da região: língua-de-vaca na Bahia; carirú no Pará; manjongo no Ceará; Maria gombi no Rio de Janeiro; Maria gorda, beldroega miúda, João Gomes e inhá-gome em São Paulo¹².

A família a que pertence, portulacaceae, é constituída de ervas ou sub-arbustos de folhas carnosas, com estípulas secas, membranosas. São anuais geralmente. Flores pequenas e pouco vistosas, cíclicas e actinomorfas, de perigônio diferenciado em cálice e corola, ovário unilocular, flores geralmente coloridas¹⁵. São conhecidas cerca de 500 espécies, na maioria americanas, tropicais. No nordeste bra-

sileiro são abundantes no solo seco e servem como plantas forrageiras para as cabras¹⁵.

Talinum paniculatum (Jacq.) Gaertn. é excelente verdura. As folhas são refrigerantes e mucilaginosas. A raiz é medicinal e anti-escorbútica. Vegeta em todo o país³.

IFON, E. T. & BASSIR, O.^{4,5,6} encontraram altos teores de proteína, piridoxina, riboflavina, cálcio, ferro e lipídios na espécie *Talinum triangulare*, africana.

Talinum paniculatum (Jacq.) Gaertn. possui flores esféricas, miúdas (cerca de 1mm de diâmetro), cinco pétalas de coloração vermelha, destacáveis sob o aumento do estereomicroscópio. As anteras (observadas ao estereomicroscópio) são amarelas. Sementes esféricas, miúdas, espermoderma quebradiço, cor preta.

As folhas são alternas ou opostas, em disposição perpendicular duas a duas (disposição oposta). São elípticas, carnosas, sésseis, de dimensões variáveis, em média 7,5 cm de comprimento por 3,5 cm de largura. A secção transversal do caule é aproximadamente triangular ou circular, cerca de 4mm de diâmetro.

As folhas têm coloração verde-escura na face superior e verde-clara na face inferior. São luzidias e glabras. Apenas a nervura central é perceptível, sendo bem saliente na face dorsal, e impressa na face ventral. Há estípulas vestigiais, quase imperceptíveis à vista desarmada. Observadas sob os aumentos do estereomicroscópio, as estípulas apresentam coloração avermelhada.

As folhas são glabras, e apresentam estômatos em ambas as epidermes, que diferem apenas quanto à dimensão relativa das células: as células da epiderme superior apresentam dimensões maiores em relação às células da epiderme inferior. Estômatos do tipo paralelocítico, característicos da família.¹⁰

Observadas em corte transversal, as folhas apresentam duas camadas de parênquima paliádico pouco nítido. Os feixes vasculares são do tipo colateral, com pouco envolvimento de estrutura secundária nas partes aéreas do vegetal. Drusas e cavidades secretoras de mucilagem ocorrem em grande quantidade por todo o mesofilo. A cutícula é delgada. Células vesiculares, quase constituindo papilas, ocorrem nos bordos foliares (Fig. 1-D). Ausência de colênquima nas folhas.

Os feixes vasculares do caule aparecem separados e individualizados em secção transversal. A grande quantidade de mucilagem e a ausência de elementos mecânicos e fibrosos, tornam as folhas da planta muito tenras palatáveis, justificando seu sucesso como verdura.

O caule apresenta três ou quatro camadas de colênquima abaixo da epiderme, e este representa

seu único elemento de sustentação, tornando a erva ereta.

As raízes, de aspecto filamentosas, constam de região xilemática central, onde ocorrem de quatro a seis pólos de proto-xilema, a partir dos quais surgem os raios vasculares, e desenvolve-se o xilema secundário, delimitado pelo floema secundário e floema primário seqüencialmente, parênquima cortical e súber, na periferia.

2. *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché

Este vegetal, nativo no Brasil, já teve sua histologia descrita em trabalho anterior⁸. Por este motivo, faremos apenas um resumo de seus elementos histológicos mais característicos. CRUZ³ e PIO CORREIA¹³ relatam que as raízes cozidas e as folhas contusas são antissépticas e cicatrizantes de feridas e úlceras exteriores. Ingeridas são úteis para o fígado.

Xanthosoma atrovirens C. Koch e Bouché, da família Araceae, é planta herbácea, cerca de 1,20m de altura, folhas sagitadas, de dimensões variáveis, em média 40 cm por 25 cm. A coloração verde de suas partes superiores permite a distinção relativamente à espécie *Xanthosoma violaceum* Schott, que lhe é muito próxima, e cujas nervuras e pecíolo apresentam coloração arroxeada. Ambas as espécies são comestíveis, muito saborosas, e largamente empregadas pela população rural de Minas, Goiás e São Paulo.

O pecíolo e a nervura mediana apresentam feixes de fibras celulósicas sub-epidérmicas, ductos de látex e idioblastos contendo "bolsas de rafídeos". A bainha foliar, pelas suas características histológicas, mostra ser um órgão de transição entre a folha e o pecíolo. As folhas apresentam simetria dorsiventral, aerênquimas que se destacam pelas dimensões avantajadas e pela frequência com que ocorrem. Na epiderme inferior ocorrem papilas. Estômatos do tipo paracítico fazem-se presentes em ambas as epidermes.

3. *Amaranthus hybridus* L.

A família Amaranthaceae Juss., formada por cerca de 60 gêneros e 900 espécies, é difundida nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas da América e da África. No Brasil, ocorrem 12 gêneros com cerca de 86 espécies².

São ervas anuais ou perenes, raramente sub-arbustivas, com folhas alternas ou opostas, glabras ou pilosas, às vezes carnosas, sem estípulas. Flores geralmente pequenas, dispostas em inflorescências densas, capituliformes, ou em espigas congestas².

A presença de alcalóides, saponinas e taninos foi observada por AYNILIAN et alii¹ e SABACHI et alii¹⁴ em *Amaranthus hybridus* L. IFON & BASSIR^{4,5,6} encontraram altos teores de minerais e proteínas nesta espécie. Observaram, inclusive,

que é alta a taxa de assimilação do ferro presente nas folhas para síntese de hemoglobina em ratos anêmicos (estudo farmacológico).

As folhas de *Amaranthus hybridus* L. são pecioladas, alternas, inflorescências congestas, axilares. A nervura central é saliente na face dorsal e impressa na face ventral. Em termos de coloração, as folhas apresentam tom mais escuro de verde em sua face dorsal, relativamente à face ventral, mais clara. As nervuras, o pecíolo e a inflorescência apresentam coloração bordô, característica.

O parênquima mesofílico tem estrutura dorsiventral, tendendo a isobilateral. A cutícula é espessa.

A nervura central apresenta feixes do tipo colateral. As células parenquimáticas apresentam espessamento celulósico das paredes, nos pontos em que estas se tocam, à semelhança de um colênquima (Fig. 8). Ocorrem tricomas tectores pluricelulares capitados com cabeça esférica em ambas as epidermes. Grandes células parenquimáticas dispõem-se radialmente em torno dos feixes vasculares, constituindo estrutura Kranz. Também é peculiar a disposição de grandes drusas contidas em idioblastos, que flanqueiam as células da estrutura Kranz. Estômatos ocorrem em ambas as epidermes, com a mesma frequência, aproximadamente. As paredes celulares são mais retas na epiderme superior do que na inferior. Os estômatos da epiderme inferior estão acima do nível das demais células epidérmicas, e isso pode ser observado no corte transversal (Fig. 6).

Ductos de látex são observados no parênquima ao nível de nervura central (Fig. 7).

Todos os espessamentos observados nas células foliares são celulósicos, mesmo aqueles espessamentos dos vasos xilemáticos. Certamente essa característica histológica contribui para conferir palatabilidade a essas folhas.

Exame químico e fito-químico

Os teores dos minerais analisados encontram-se na tabela 1

TABELA 1

Teores de minerais encontrados em *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché (taioba) e *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (língua-de-vaca)

Minerais	<i>X. atrovirens</i> * (taioba) (mg/100g)	<i>T. paniculatum</i> * (língua-de-vaca) (mg/100g)
Ferro	40	180
Magnésio	340	1.310
Cálcio	1.670	1.120

* Valor médio de seis determinações com resultados compatíveis.

JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O. & SAKUMA, A. L. — Hortaliças brasileiras — caracterização botânica e química das espécies: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché e *Amaranthus hybridus* L.. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2): 11-18, 1991.

A triagem fito-química dos princípios ativos naturais, procedida em amostras de 2 a 3g do pó seco das folhas das espécies *Amaranthus hybridus* L. (caruru), *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché (taioba) e *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (língua-de-vaca) revelou os resultados expressos na tabela 2.

TABELA 2

Triagem fitoquímica dos princípios ativos encontrados nas folhas de *Amaranthus hybridus* L. (caruru), *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché (taioba) e *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (língua-de-vaca)*

Espécie vegetal	Alcalóides				Cardiotônicos				Flavonóides			Saponinas			Taninos				Antraderivados Borntraeger
	M	D	B	Br	LB	K	B	S	AlCl ₃	H	E	A	B	C	D				
<i>A. hybridus</i> L. (caruru)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—				
<i>X. atrovirens</i> C. Koch e Bouché (taioba)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
<i>T. paniculatum</i> (Jacq.) Baerten (língua-de-vaca)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				

* Abreviações empregadas

Alcalóides

M = Reativo de Mayer
D = Reativo de Dragendorf
B = Reativo de Bouchardat

Cardiotônicos

LB = Lieberman-Bouchard
K = Reação de Kedde
B = Reação de Baljet

Flavonóides

S = Reação de Shinoda
AlCl₃ = Reação com cloreto de alumínio

Saponinas

H = Teste hemolítico
E = Teste afrogênico

Taninos (Soluções reagentes)

A = Com Cloreto férrico
B = Com acetato de cobre
C = Com Sulfato de quinino
D = Com acetato de chumbo

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Grande número de produtos alimentícios industrializados incluem hortaliças em suas formulações, tais como: sopas liofilizadas, mingaus e papinhas para bebês, etc. Estes produtos criam a necessidade do reconhecimento desses vegetais nos diversos graus de fragmentação em que se apresentam, a fim de se controlar a qualidade do produto, evitando e reconhecendo fraudes e adulterações.

A escolha dessas espécies para estudo deve-se à popularidade que as mesmas adquiriram junto à população rural, o que justificaria seu cultivo e industrialização.

A portulacácea em estudo apresenta estômatos e tipos de feixes vasculares (separados e individualizados) característicos da família a que pertence. A ocorrência de cavidades mucilaginosas, a grande quantidade de mucilagem nelas contida, a estrutura do mesofilo, a presença de drusas e células vesiculares nos bordos foliares, permitem a diagnose a nível de espécie.

Uma vez submetida a tratamento térmico e trituração intensos, destacamos as drusas e as células vesiculares de *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. como recursos valiosos para o seu reconhecimento em produtos industrializados.

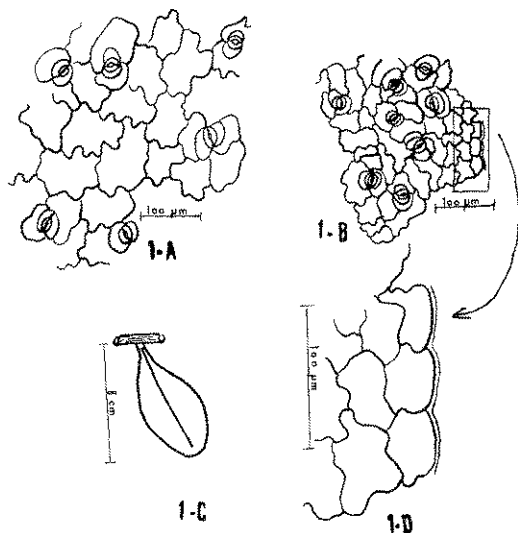


FIGURA 1 - *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. - FOLHA
 1-A = EPIDERMIS SUPERIOR (CORTE PARADÉRMICO)
 1-B = EPIDERMIS INFERIOR (CORTE PARADÉRMICO)
 1-C = ASPECTO GERAL
 1-D = CÉLULAS VESICULARES DA BORDA FOLIAR

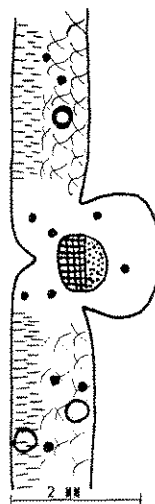


FIGURA 2 - *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. - NERVURA MEDIANA - Desenho esquemático do corte transversal
 Par. pai.: parênquima paliçádico; par. lac.: parênquima lacunoso; cav. sec. muc.: cavidade secretora de mucilagem; dr.: drusas

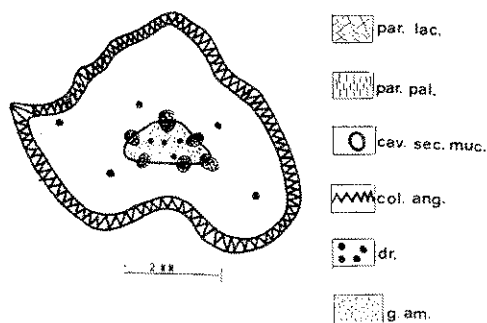


FIGURA 3 - *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. - CAULE - Desenho esquemático da secção transversal
 Col. ang.: colênquima angular; g. am.: grãos de amido, dr.: drusas.

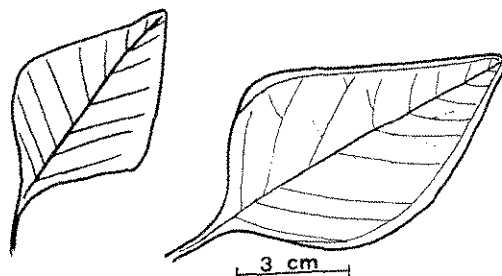


FIGURA 4 - *Amaranthus hybridus* L. - Folhas - Aspecto geral.

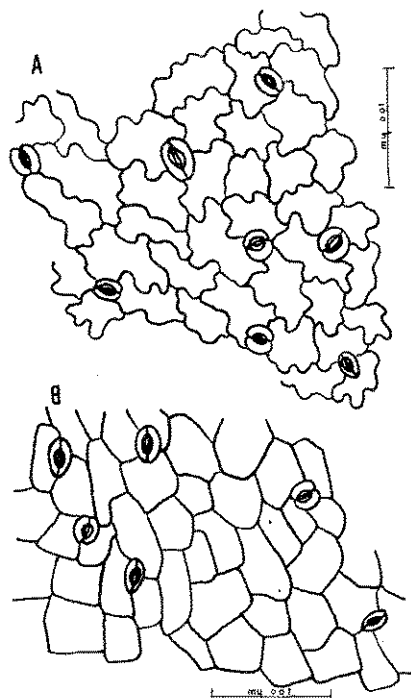


FIGURA 5 - *Amaranthus hybridus* L. - EPIDERMES FOLIARES
A = Epiderme inferior
B = Epiderme superior

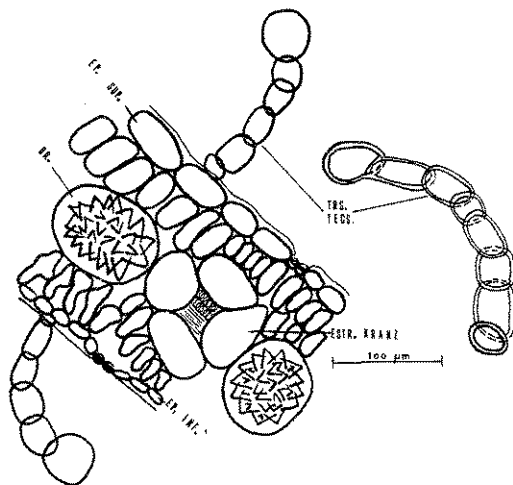


FIGURA 6 - *Amaranthus hybridus* L. - FOLHA - Corte transversal do mesofilo
Ep. sup.: epiderme superior; trs. tecs.: tricomas tectores; dr.: drusas; ep. inf.: epiderme inferior.

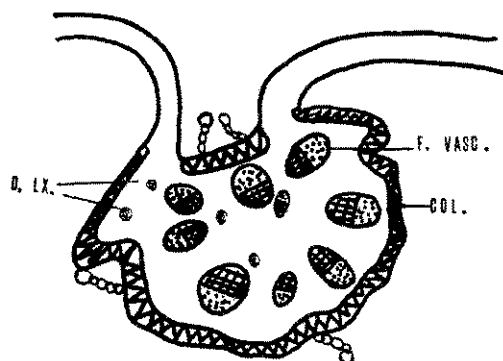


FIGURA 7 - *Amaranthus hybridus* L. - Folha - Desenho esquemático da nervura mediana
F. VASC.: feixe vascular; d. lx.: ductos de latex; col.: colênquima.

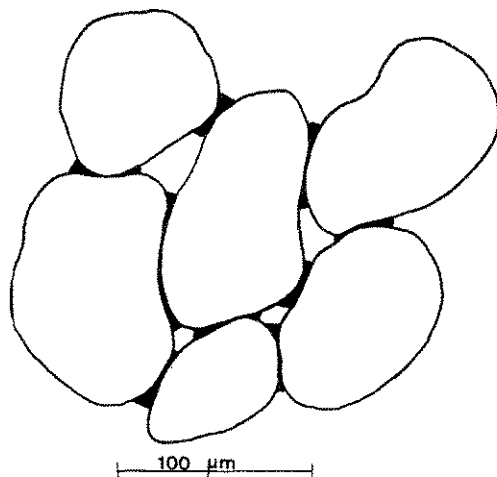


FIGURA 8 - *Amaranthus hybridus* L. - Folha - Células parenquimáticas observadas em corte paradérmico (vista frontal)

A araceae em estudo é rica em características estruturais (tipo de estômatos, inclusões citoplasmáticas, fibras, etc) que possibilitam a diagnose a nível de gênero. O reconhecimento da espécie, contudo, dependerá da observação concomitante da coloração das nervuras foliares⁸.

METCALFE & CHALCK¹⁰ relatam a ocorrência de estrutura Kranz em folhas de amarantáceas, chamando atenção para a distribuição restrita que esta estrutura apresenta entre as dicotiledôneas. Estrutura Kranz é mais freqüente entre as monocotiledôneas, particularmente entre as gramíneas e ciperáceas, afirmam os autores^{9,10,11}.

A presença de estrutura Kranz e de cristais (drusas) de oxalato de cálcio, bem como o espessamento secundário anômalo verificado no caule (não estudamos o caule de *Amaranthus hybridus* L. neste trabalho), aproximam Amaranthaceae de Caryophyllaceae, segundo METCALFE & CHALK¹⁰.

A presença de tricomas tectores capitados e de colênquima angular bem desenvolvido nas nervuras, também são características da família Amaranthaceae, segundo METCALFE & CHALK¹⁰.

Algumas características anatômicas de *Amaranthus hybridus* L. (caruru) podem ser consideradas como adaptações ecológicas quanto à alta incidência luminosa das regiões em que a planta vegeta: o espessamento parietal das células parenquimáticas evitaria o colapso das células em situações de "stress" hídrico; as paredes relativamente retas da epiderme superior ofereceriam uma resistência à perda de água.

A escassez de estrutura secundária e de elementos histológicos lignificados é constante dentro dos vegetais empregados como hortaliças.

Encontramos ductos de látex no caule de *Amaranthus hybridus* L. (caruru). Ductos de látex ainda não foram relatados na literatura para a família Amaranthaceae.

Já sabemos através dos trabalhos de IFON & BASSIR^{4,5,6}, que *Amaranthus hybridus* L. (caruru) é rica em ferro. Através deste nosso trabalho, observamos que também as espécies *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché (taioba) e *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. são riquíssimas não somente em ferro, mas também em magnésio e cálcio. Para ter-se uma idéia do potencial ferruginoso destas plantas, basta lembrar que *Spinacia oleracea* (espinafre), considerada rica em ferro, contém aproximadamente 30 mg/100 g de ferro (espinafre cru e seco); portanto, a taioba é 33% mais rica em ferro que o espinafre; e o caruru é 600% mais rico em ferro, do que o espinafre!

Amaranthus hybridus L. (caruru), ainda revelou-se espécie rica em saponinas, confirmando expectativas tiradas da literatura química existente acerca da família Amaranthaceae^{1,14}.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Lúcia Rossi, do Instituto de Botânica, SP - Capital, pela identificação das espécies estudadas neste trabalho.

RIALA6/702

JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O. & SAKUMA, A. L. - Brazilian vegetables - botanical and phyto-chemistry characterization of the species: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché e *Amaranthus hybridus* L.. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):11-18, 1991.

ABSTRACT: There are described main botanical and phyto-chemistry characteristics of three native vegetable species with the objective of identify them, mainly when presented under industrious form, striongly triturated (sops, paps for children, etc). Drawings follow the botanical descriptions.

DESCRIPTORS: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.; *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché; *Amaranthus hybridus* L.; lingua-de-vaca; taioba; caruru.

JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O. & SAKUMA, A. L. — Hortaliças brasileiras — caracterização botânica e química das espécies: *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Xanthosoma atrovirens* C. Koch e Bouché e *Amaranthus hybridus* L.. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2): 11-18, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AYNILIAN, G. J.; ABOU-CHAR, C. I. & EDGECOMBE, W. — Screening of herbarium specimens of native plants from the families Amaranthaceae, Dipsacaceae and Orobanchaceae for alkaloids, saponins and tannins. *Planta Med.*, 19(4): 306-10, 1971.
2. BARROSO, G. M. — *Sistemática de angiospermas do Brasil*. São Paulo, EDUSP, 1978. v. 1. p. 98-9.
3. CRUZ, G. L. — *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, 1982, p. 132.
4. IFON, E. T. & BASSIR, O. — The efficiency of utilizing the iron in leafy green vegetables for hemoglobin synthesis by anemic rats. *Nutr. Rep. Int.*, 18(4): 481-6, 1978. apud *Chem. Abstr.* 89:476, 1978.
5. IFON, E. T. & BASSIR, O. — The nutritive value of some nigerian leafy green vegetables. Part 1. vitamin and mineral contents. *Food Chem.*, 4(4): 263-7, 1979.
6. IFON, E. T. & BASSIR, O. — The nutritive value of some Nigerian green vegetables. Part 2. The distribution of protein, carbohydrates (including ethanol-soluble simple sugars), crud fat, fibre and ash. *Food Chem.*, 5: 231-5, 1980.
7. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. p. 32-9.
8. JORGE, L. I. F.; MOREIRA, T. F. & FERRO, V. O. — *Xanthosoma atrovirens* c. Koch & bouché (taioba). Principais características morfológicas e anatômicas. *Rev. bras. Farmacogn.*, 1(2): 154-65, 1986.
9. METCALFE, C. R. & CHALK, L. — *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 1950, v. 1, p. 153-6.
10. METCALFE, C. R. & CHALK, L. — *Anatomy of the Dicotyledons*. 2. ed. Oxford, Clarendon Press, 1979, v. 1. p. 100-1, 178.
11. NAIDIR, K. & RAMAMUSTHY, D. U. — Leaf anatomy in relation to photosynthetic characters of C₃ and C₄ plants of Amaranthaceae. *Indian J. Plant Physiol.*, 24(4): 335-44, 1981.
12. PENNA, M. — *Dicionário brasileiro de plantas medicinais: descrição das plantas medicinais indígenas e das exóticas aclimadas no Brasil*. 3. ed. Rio de Janeiro, Kosmos, 1946. p. 376.
13. PIO CORREA, M. — *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1978, v. 4. p. 663.
14. SABACHI, M.; RAMIZANIAN, M.; JAFFARI, G.; HERAVI, G.; BEHOEDINNI, F. & AYNEHCHI, Y. — Survey of Iranian plants for saponins, alkaloids, flavonoids and tannins. IV. The plants of Kerman Province. *Int. J. Crude Drug Res.*, 23(4): 165-75, 1985.
15. SCHULTZ, A. R. — *Introdução ao estudo da botânica sistemática*. 3. ed. Rio de Janeiro, Globo, 1963, v. 2, p. 104-5.

Recebido para publicação em 28 de maio de 1990.

FRAUDES E SUJIDADES EM CONDIMENTOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO PAULO*

Claydes de Quadros ZAMBONI**
Helena Ide ALVES**
Regina Maria M. Silva RODRIGUES**
Nazareth SPITERI**
Marcia Bittar ATUI**
Marlene Correia dos SANTOS**

RIALA6/703

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ATUI, M.B. & SANTOS, M.C. — Fraudes e Sujidades em Condimentos comercializados na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2): 19-22, 1991

RESUMO: Foram analisadas 217 amostras de quatro tipos de condimentos: 48 amostras de cravo da Índia, 55 de erva-doce, 57 de canela moída e 57 de cominho, disponíveis no comércio de São Paulo, Capital, de janeiro de 1986 a janeiro de 1989, com a finalidade de pesquisar fraudes e sujidades. O método para identificação dos elementos histológicos dos vegetais foi desenvolvido na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz e o método para pesquisa de material estranho foi o descrito no "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)" com modificações. Verificou-se que 112 das amostras (51,61%) estavam em desacordo com a legislação, das quais 95 (84, 82%) estavam fraudadas com amidos ou condimentos de outras espécies vegetais; 34 (30,36%) continham matéria arenosa ou terrosa; 10 (8,93%) foram condenadas por fungos e 6 (5,36%) continham insetos ou ácaros. Os condimentos moídos apresentaram maior porcentagem de fraudes (30,97%) em relação aos inteiros (19,82%). Dos condimentos moídos, o cominho foi o mais fraudado (52,63%). Dos condimentos inteiros, a erva-doce foi a mais fraudada (65,45%).

DESCRITORES: condimentos, cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), canela (*Cinnamomum* sp), cominho (*Cuminum cyminum*), fraudes em condimentos, sujidades em condimentos, análise microscópica.

INTRODUÇÃO

Os condimentos são substâncias sápidas de origem natural empregadas no alimento com o fim de modificar ou exaltar o seu sabor. Essas substâncias deverão ser puras, sãs e limpas, corresponderem às suas características botânicas normais e estarão isentas de substâncias estranhas, elementos vegetais estranhos à espécie ou de parte da planta de origem que não possuam as características de condimentos vegetal. Os condimentos não podem apresentar sujidades, insetos, fungos, areia ou outras substâncias estranhas em quantidade que in-

dique a utilização de ingredientes em condições higiênicas insatisfatórias ou processamento tecnológico inadequado^{2,5}.

Na pesquisa de fraudes e sujidades em condimentos, tem-se observado que as exigências impostas pela legislação não estão sendo cumpridas. Em trabalho anterior, detectou-se fraudes em pimenta do reino preta, moída⁶.

Elaborou-se o presente trabalho a fim de verificar as condições de higiene e fraudes em condimentos de uso mais comum, como cravo, canela, cominho e erva-doce.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP e apresentado no 12º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Rio de Janeiro, R.J., 1989.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 217 amostras de quatro tipos de condimentos, sendo: 48 amostras de cravo da Índia, 55 de erva-doce, 57 de canela moída e 57 de cominho. As amostras foram colhidas pela Vigilância Sanitária ou adquiridas em supermercados, mercearias e feiras livres de São Paulo, Capital, de janeiro de 1986 a janeiro de 1989.

As amostras foram analisadas pelos seguintes métodos:

A — Método para identificação de elementos histológicos característicos e estranhos.

O método para identificação de elementos histológicos característicos do produto e para a pesquisa dos elementos vegetais estranhos foi desenvolvido na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, baseado nos princípios descritos por Wallis⁸.

Procedimento - Homogeneizar a amostra, pesar cerca de 5g em uma placa de Petri. Observar a amostra ao microscópio estereoscópico (em aumento de 20 vezes). Transferir a amostra para um béquer, adicionar 50 ml de solução de hipoclorito de sódio a 10% e deixar em contato até o clareamento do material. Filtrar a vácuo so-

bre papel de filtro lavando o material várias vezes com água filtrada. Montar lâminas com o resíduo em água glicerizada a 2%, identificar os elementos histológicos característicos do vegetal e pesquisar os estranhos^{3,4,6,7,8,9,10,11}.

B — Método para pesquisa de material estranho.

O método utilizado foi o descrito pela A.O.A.C.¹, com modificações.

Procedimento - Colocar 20g de amostra em um cálice de 250 ml contendo 200ml de clorofórmio. Misturar cuidadosamente a amostra e deixar sedimentar por um minuto. Decantar a camada de clorofórmio, de modo que o resíduo permaneça no béquer. Adicionar 100ml de tetracloreto de carbono, deixar sedimentar e decantar novamente. Filtrar o resíduo do béquer em papel de filtro. Secar o papel à temperatura ambiente e examiná-lo ao microscópio estereoscópico com aumento de 20 vezes.

RESULTADOS

Os resultados estão relacionados nas tabelas 1, 2 e no Quadro 1.

TABELA 1

Fraudes em condimentos moídos e inteiros

Condimento	Moído		Inteiro				Total		
	Puro		Puro		Fraudado				
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)			
Canela	41	(71,93)	16	(28,07)	0	(0,00)	0	(0,00)	57
Cominho	16	(28,07)	30	(52,63)	10	(17,54)	1	(1,76)	57
Cravo	1	(2,08)	18	(37,50)	23	(47,92)	6	(12,50)	48
Erva-doce	0	(0,00)	3	(5,46)	16	(29,09)	36	(65,45)	55

TABELA 2

Vegetais e materiais estranhos encontrados nas amostras de condimentos

Substâncias estranhas	Condimentos	Canela		Cominho		Cravo		Erva-doce	
		Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Vegetais estranhos		14	(24,56)	30	(52,63)	19	(40,43)	32	(58,18)
Fungos		0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	10	(1,82)
Matéria arenosa e terrosa		7	(12,28)	4	(7,02)	6	(12,77)	17	(30,91)
Insetos e ácaros		0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	6	(10,91)

QUADRO I

Vegetais estranhos (fraudes), encontrados nos condimentos analisados

Vegetais estranhos	Condimentos	Canela	Cominho	Cravo	Erva-doce
Milho		×	×	×	×
Trigo		×	×	×	
Cúrcuma		×	×	×	
Noz-moscada		×		×	
Urucum		×	×		
Arroz			x		
Pimenta do reino			×	×	
Mandioca				×	×
Canela				×	
Orégano				×	
Funcho					×
Coentro					×
Grãos de pólen		×			×
Pedúnculo				×	×
Substância amilífera alterada		×	×	×	

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O método para identificação dos elementos histológicos característicos e estranhos foi desenvolvido para o controle de qualidade e identidade dos condimentos. Na identificação microscópica dos produtos surgiram vários fatores que ofereceram dificuldades, sendo um deles a forte pigmentação dos tecidos. Assim, os condimentos foram submetidos à ação descorante do hipoclorito de sódio. Os tecidos mais frágeis de algumas espécies foram destruídos em concentrações altas de hipoclorito de sódio, sendo observado melhor resultado usando-se solução de hipoclorito de sódio a 10%. A lavagem do material após o clareamento permitiu a retirada do cloro dos tecidos vegetais, melhorando a observação do material ao microscópio.

Quanto à identidade dos condimentos, o exame microscópico permitiu detectar se o condimento era constituído de uma especiaria genuína ou fraudado com outra especiaria ou amido, através dos seus elementos histológicos característicos. Certos elementos de determinados condimentos apresentam estreita semelhança uns com os outros. Entretanto, essas dificuldades podem ser afastadas desde que o analista conheça certos detalhes diferenciais na estrutura de cada um desses elementos.

No presente trabalho, observou-se que os condimentos foram substituídos por outros de características semelhantes de preço inferior ou por amido, areia ou terra; intencionalmente ou oriundos de processamento inadequado.

Pela Tabela 1, verifica-se que os condimentos moídos apresentaram maior porcentagem de frau-

des (30,87%) em relação aos inteiros (19,82%) e que, dos moídos, o cominho foi o mais fraudado (52,63%). O Quadro I mostra que o cominho foi parcialmente substituído por seis vegetais estranhos, sendo a maioria de preço inferior. É importante salientar que, muitas vezes, por falta de conhecimento do fabricante, os condimentos são moídos em um único moído, sem uma prévia limpeza, resultando num produto que é uma mistura de condimentos.

Pela Tabela 1 verifica-se que, dos condimentos inteiros, a erva-doce foi a mais fraudada (65,45%), fraude essa, superior à dos moídos. Verificou-se que a erva-doce foi substituída total ou parcialmente por funcho de características morfológicas semelhantes e de preço inferior.

O Quadro I mostra que, tanto a erva-doce como o cravo foram fraudados com pedúnculos, que são partes da planta de origem, mas que não possuem as características do condimento vegetal^{2,5}. Quanto à canela, verifica-se que (Quadro I) além do amido foi fraudada com cúrcuma e urucum, cujas colorações assemelham-se à da canela, com a finalidade de enganar o consumidor.

De todos os amidos utilizados na indústria de alimentos, constatou-se que o amido de milho foi o mais usado para fraudar os condimentos, sendo identificado nos quatro tipos de produtos estudados (Quadro I).

Quanto à sanidade dos condimentos, pode-se verificar pela Tabela 2 que 1,82% das amostras de erva-doce continham fungos, que foram detectados microscopicamente e são indicadores de contaminação da matéria-prima ou do produto no ar-

mazenamento. As matérias arenosas e terrosas foram as sujidades presentes em todos os condimentos, tendo a erva-doce a maior porcentagem de amostras contaminadas (30,91%).

Verifica-se pela Tabela 2, que, das substâncias estranhas, os vegetais estranhos às espécies são responsáveis pelo maior número de amostras condenadas e que, de todos os condimentos, a erva-doce apresentou o maior grau de contaminação com todos os tipos de substâncias estranhas.

Das 217 amostras de condimentos analisadas, 105 (48,39%) estavam de acordo com a legislação e 112 (51,61%) em desacordo.

Das 112 amostras de condimentos condenados, verificou-se que 95 (84,82%) estavam fraudadas com amido ou condimentos de outras espécies de vegetais; 34 (30,35%) continham matéria arenosa ou terrosa; 10 (8,93%) foram condenadas por conter fungos e 6 (5,36%) continham insetos ou ácaros.

RIALA6/703

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ATUI, M.B. & SANTOS, M.C. - Adulteration and filth in spices. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):19-22, 1991

ABSTRACT: 217 samples of four kinds of spices: 48 of cloves, 55 of anise, 57 of cassia and 57 of cumin acquired in São Paulo, Brazil trade, were examined for adulteration and for filth detection, from 1986 to 1989. Microscopical examination showed that 112 samples (51,61%) were disagreeing with Brazilian Legislation: 95 (84,82%) were adulterated with starch or with spices of other kinds; 34 (30,35%) contained sand or soil; 10 (8,93%) were adulterated with mycelia filaments and 6 (5,36%) contained insects or mites. Ground spices were more adulterated (30,87%) than whole spices (19,82%) and ground cumin were more adulterated than the others ground spices (52,63%). Whole anise were more adulterated than the others whole spices (65,45%).

DESCRIPTORS: Spices, cloves (*Syzygium aromaticum*), anise (*Pimpinella anisum*), cassia (*Cinnamomum* sp), cumin (*Cuminum cyminum*), adulteration of spices, filth in spices, microscopical examination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14 th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984. p.899 (Tec. 44.049).
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução n.º 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. 1, p. 11521-5. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)...
3. MENEZES JÚNIOR, J.B.F. - Investigações sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9 : 62-75, 1949.
4. PEARSON, D. ed. - *The chemical analysis of foods*. 6th ed. London Churchill, 1970. p. 302-31.
5. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. - Decreto n.º 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978, p. 32 (NTA 70). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentação e Bebidas.
6. SILVEIRA, N.V.V., ZAMBONI, C.Q. & TAKAHASHI, M.Y. - Fraudes da pimenta do reino preta (*Piper nigrum*), moída. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2), 69-79, 1983.
7. WALLIS, T.E. - *Microscopia analítica: sus fines y metodos en relacion a los alimentos, água, especiais y medicamentos*; trad. por J.G. Berengerer. Zaragoza, Acribia, 1968.p.133-4.
8. *Id. ibid.*, p. 166-8.
9. WINTON, A.L. & WINTON, K.B. - *The structure and composition of foods*. New York, John Wiley, 1939.p.177-459.
10. ZAMBONI, C.Q. coord. - *Manual de análise microscópica de alimentos*. São Paulo, 1968.p.30-2 (apostila mimeografada).
11. *Id.*, *ibid.*, p. 52-3.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1990.

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.
I — COMPOSIÇÃO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA NO MUNICÍPIO
DE SÃO ROQUE, REGIÃO DE SOROCABA.

Helena Hilomi TANIGUCHI*
José Eduardo TOLEZANO*
Fernando M. de Azevedo CORRÊA**
Roberto Henrique P. MORAES**
Rosa Maria de O. VEIGA**
Ana Maria MARASSÁ**

RIALA6/704

TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E.; CORRÊA, F.M.A.; MORAES, R. H.P.; VEIGA, R.M.O. & MARASSÁ, A.M. - Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. I - Composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, região de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):23-30, 1991.

RESUMO: O estudo da fauna flebotomínica em áreas endêmicas para Leishmaniose Tegumentar Americana é parte integrante de uma proposta de implantação de um Serviço de Leishmanioses em Laboratório de Saúde Pública no Estado de São Paulo. Neste estudo procurou-se reconhecer as espécies encontradas no Município de São Roque; as coletas foram efetuadas semanalmente, entre agosto/87 e março/89. Dos 15.094 exemplares obtidos, destacam-se 04 espécies (*Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. fischeri* e *Lu. migonei*, os quais totalizaram 98,42%. *Lutzomyia whitmani* predominou em margem de mata (49,76%) enquanto *Lu. intermedia* (71,53%) foi a mais encontrada em ambiente domiciliar e *Lu. fischeri* (63,47%) no interior de mata, revelando, assim, uma variação específica conforme o ambiente estudado. Isto pode significar que, diferentes espécies de flebotomíneos sejam responsáveis pela manutenção de *Leishmania* conforme o ecossistema encontrado nas áreas endêmicas.

DESCRITORES: Fauna flebotomínica, composição; Leishmaniose Tegumentar Americana, Município de São Roque, Estado de São Paulo.

INTRODUÇÃO

Estimativas da Organização Mundial de Saúde apontam, em todo o mundo, um total de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de aquisição de leishmaniose, sendo que cerca de 12 milhões de indivíduos estariam infectados por flagelados do gênero *Leishmania*^{2,15}.

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) parece estar espalhada por quase todo o território¹². No Estado de São Paulo, segundo dados do Centro de Informações da Saúde e do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria

de Estado da Saúde, grande concentração de casos ocorre em áreas rurais das regiões do Vale do Ribeira, Presidente Prudente, Sorocaba, Campinas e Ribeirão Preto.

No Município de São Roque, na região de Sorocaba, a partir de 1985, começaram a ser notificados, esporadicamente, casos humanos de LTA.

Como parte integrante de uma proposta de implantação de um Serviço de Leishmanioses em Laboratórios de Saúde Pública no Estado de São Paulo, vem sendo desenvolvidas amplas investigações epidemiológicas, em áreas endêmicas para LTA, junto às populações humanas, de animais silvestres

* Do Instituto Adolfo Lutz.

** Do Instituto Butantan.

e domésticos, de flebotômicos e de flagelados do gênero *Leishmania*.

Em relação aos flebotômicos, os estudos objetivavam não somente o reconhecimento das espécies existentes no ambiente endêmico, mas também o papel desempenhado por tais artrópodes nesse meio, quer sejam os vetores primários quer sejam os principais transmissores ao homem.

No presente trabalho pretende-se divulgar os resultados referentes à composição da fauna flebotômica do Município de São Roque, na região de Sorocaba, nos ambientes florestal, da margem de mata e domiciliar, com a utilização de diferentes métodos de coleta, além da investigação de infecção natural por protozoários do gênero *Leishmania*.

MATERIAL E MÉTODOS

O Município de São Roque dista, aproximadamente, 60 km da Capital do Estado de São Paulo, situando-se entre os Meridianos 47° e 50° a Oeste de Greenwich e os Paralelos de 22°30' e 25° de Latitude Sul, numa altitude média de 798 metros^{20,21}.

Este Município ocupa uma área de 412 km², dos quais 238 km² correspondem à zona rural. As principais atividades econômicas são a indústria têxtil, de bebidas, de látex, de cimento, além da atividade agrícola, cuja produção consiste de uva, batata, milho, feijão, etc.

O clima da região é temperado brando, sem estiagem, ficando a temperatura média em 22°C nos meses mais quentes do ano e o índice pluviométrico anual variando de 1.200 a 1.300 mm (Tabela 1).

TABELA 1

Dados meteorológicos referentes ao Município de São Roque, Estado de São Paulo. Período de agosto/87 a março/89.

Mês	T°C	U.R. %	Ind. Pluv.
agosto/87	21,6
setembro/87	17,42	64,73	70,1
outubro/87	20,23	64,55	83,7
novembro/87	20,28	65,45	82,2
dezembro/87	21,67	68,30	127,9
janeiro/88	23,57	66,81	138,9
fevereiro/88	21,69	71,48	195,2
março/88	21,79	65,72	194,2
abril/88	19,87	72,56	10,8*
maio/88	17,87	79,12	194,2
junho/88	14,92	76,15	67,0 (geadas leves)
julho/88	13,58	69,95	3,0
agosto/88	16,75	62,88	...
setembro/88	19,16	62,21	41,2
outubro/88	18,67	73,70	152,7
novembro/88	20,42	71,88	91,4
dezembro/88	21,54	71,80	213,5
janeiro/89	22,07	79,38	387,7
fevereiro/89	22,70	78,91	...
março/89	22,34	75,44	...

Fonte: Estação Experimental de São Roque do Instituto Agrônomo de Campinas.

* Pluviômetro com defeito (dados referentes a 14 dias)

A topografia é bastante acidentada e montanhosa, sendo cortada por alguns cursos d'água como o Carambé, Araçai e o Tietê. A vegetação é do tipo Mata Latifoliada Tropical, mata imponente com árvores atingindo 25 metros de altura; de sua flora original muito pouco subsiste em virtude das derrubadas e queimadas para dar lugar a lavouras

diversas. Destaca-se, entretanto, a mata da Câmara que vem sendo preservada, visando estabelecer o equilíbrio entre a compleição paisagística e as atividades recreativas turísticas^{20,21}.

No Município de São Roque, as coletas de flebotômicos foram efetuadas dentro dos limites da



Figura 1
Barraca de Shannon modificada



Figura 2
Armadilha Luminosa Tipo Falcão Modificada

Fazenda São Joaquim pertencente ao Instituto Butantã da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Esta área foi selecionada pelo fato de apresentar as mesmas características fitogeográficas do restante da região onde ocorreram os casos humanos. Associam-se a isto, as facilidades de acesso e acomodações da equipe de trabalho no período de desenvolvimento das investigações.

No período compreendido entre agosto/87 e março/89, foram realizadas capturas semanais no horário das 19:00 às 24:00 horas, no domicílio, no interior e margem de mata, tendo sido efetuadas, ainda, capturas de 24 horas consecutivas em cada uma das quatro estações climáticas do ano, quando se registraram a cada hora, os valores de umidade relativa do ar e de temperatura.

As coletas de flebotomíneos foram realizadas utilizando-se barraca de Shannon modificada (Figura 1) — no interior e margem da mata — com captura através de aspiradores do tipo “Capturador de Castro”. Foi utilizada, também, armadilha luminosa tipo Falcão modificada¹⁸ (Figura 2) em dois ambientes (interior e margem de mata) e capturadores de Castro no domicílio. As iscas empregadas foram luz, o homem e o hamster.

Dos flebotomíneos capturados, 1.008 exemplares foram dissecados para pesquisa de infecção na-

tural por flagelados do gênero *Leishmania*. A metodologia utilizada foi a descrita por JOHNSON et alii, 1963¹³. Todos os demais insetos foram conservados em álcool a 70%, diafanizados em lactofenol e montados entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese para identificação e classificação. A nomenclatura adotada para identificação foi a proposta por MARTINS et alii, 1978¹⁶.

RESULTADOS

Foram coletados, no total, 15.094 insetos, sendo que 15.055 distribuíram-se entre 17 diferentes espécies de flebotomíneos. Para outros 39 exemplares, não foi possível identificação que permitisse classificação além do nível genérico (Tabela 2).

Os dados contidos na Tabela 2, indicam a frequência dos flebotomíneos capturados, distribuídos segundo sexo, sendo 8.526 (56,49%) fêmeas e 6.568 (43,51%) machos. Raramente foram encontradas fêmeas que se mostrassem repletas de sangue.

A grande maioria dos flebotomíneos coletados, 14.855 (98,42%), pertenciam a apenas 4 espécies: *Lutzomyia whitmani* com 6.264 (41,50%) exemplares, *Lu. intermedia* com 5.085 (33,69%), *Lu. fischeri* com 2.760 (18,28%) e *Lutzomyia migonei* com 746 (4,94%).

TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E; CORRÊA, F.M.A.; MORAES, R. H.P.; VEIGA, R.M.O. & MARAS-SÁ, A.M. - Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. I - Composição da fauna flebotomílica no município de São Roque, região de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):23-30, 1991.

TABELA 2

Frequência de flebotomíneos coletados no Município de São Roque, distribuídos segundo sexo. Período de agosto/87 a março/89.

ESPÉCIE	FÊMEAS		MACHOS		TOTAL	%
	Nº		Nº			
<i>Lutzomyia whitmani</i>	3.668		2.596		6.264	41,50
<i>Lu. intermedia</i>	2.955		2.130		5.085	33,69
<i>Lu. fischeri</i>	1.264		1.496		2.760	18,28
<i>Lu. migonei</i>	430		316		746	4,94
<i>Lu. lloydi</i>	53		—		53	0,35
<i>Lu. alphabetica</i>	37		01		38	0,25
<i>Lu. edwardsi</i>	33		04		37	0,24
<i>Lu. firmatoi</i>	19		06		25	0,16
<i>Brumptomyia</i> sp	20		01		21	0,14
<i>Lu. pascalei</i>	06		06		12	0,08
<i>B. amarali</i>	11		—		11	0,07
<i>Pintomyia</i> sp	08		01		09	0,06
<i>Psychodopygus</i> sp	09		—		09	0,06
<i>B. nitzulescui</i>	—		06		06	0,04
<i>Lu. shannoni</i>	06		—		06	0,04
<i>Lu. misionensis</i>	04		—		04	0,03
<i>B. mangabeirai</i>	—		03		03	0,02
<i>B. cardosoi</i>	—		02		02	0,01
<i>Lu. termitophila</i>	02		—		02	0,01
<i>Lu. monticola</i>	01		—		01	0,007
Total	8.526		6.568		15.094	100,0

TABELA 3

Frequência de flebotomíneos coletados no Município de São Roque, Estado de São Paulo, distribuídos segundo tipo de capturador. Período de agosto/87 a março/89.

ESPÉCIE	CAP. CASTRO		LUMINOSO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Lutzomyia whitmani</i>	6.185	40,98	79	0,52	6.264	41,50
<i>Lu. intermedia</i>	5.052	33,47	33	0,22	5.085	33,69
<i>Lu. fischeri</i>	2.695	17,85	65	0,43	2.760	18,28
<i>Lu. migonei</i>	737	4,88	09	0,06	746	4,94
<i>Lu. lloydi</i>	47	0,31	06	0,04	53	0,35
<i>Lu. alphabetica</i>	32	0,21	06	0,04	38	0,25
<i>Lu. edwardsi</i>	15	0,10	22	0,14	37	0,24
<i>Lu. firmatoi</i>	22	0,14	03	0,02	25	0,16
<i>Brumptomyia</i> sp	09	0,06	12	0,08	21	0,14
<i>Lu. pascalei</i>	09	0,06	03	0,02	12	0,08
<i>B. amarali</i>	09	0,06	02	0,01	11	0,07
<i>Pintomyia</i> sp	08	0,05	01	0,007	09	0,06
<i>Psychodopygus</i> sp	05	0,03	04	0,03	09	0,06
<i>B. nitzulescui</i>	04	0,03	02	0,01	06	0,04
<i>Lu. shannoni</i>	04	0,03	02	0,01	06	0,04
<i>Lu. misionensis</i>	04	0,03	—	—	04	0,03
<i>B. mangabeirai</i>	01	0,007	02	0,01	03	0,02
<i>B. cardosoi</i>	01	0,007	01	0,007	02	0,01
<i>Lu. termitophila</i>	02	0,01	—	—	02	0,01
<i>Lu. monticola</i>	01	0,007	—	—	01	0,007
Total	14.842	98,33	252	1,67	15.094	100,0

Pela Tabela 3, é possível a verificação da frequência dos flebotomíneos coletados, distribuídos segundo tipo de capturador utilizado.

De um total de 15.094 flebotomos, 14.842 (98,33%) foram capturados através da utilização de aspirador manual tipo capturador de Castro, na barraca de Shannon modificada ou no domicílio e 252 (1,67%) através de armadilha luminosa.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados relativos às frequências de flebotomos coletados, distribuídos segundo o ambiente em que foram capturados.

No interior de mata *Lu. fisheri*, com 351 exemplares (63,47%) foi a espécie predominante, seguida por *Lutzomyia whitmani* com 84 (15,19%), *Lu. intermedia* com 33 (5,97%), *Lu. edwardsi* com 23 (4,16%). No total, essas 4 espécies compreenderam 491 (88,79%) dos flebotomíneos coletados no interior da mata.

Na margem de mata, dos 10.519 insetos coletados, 10.362 (98,51%) foram distribuídos entre *Lu. whitmani* com 5.234 (49,76%) exemplares, *Lu. fisheri* com 2.250 (21,39%), *Lu. intermedia* com 2.175 (20,68%) e *Lu. migonei* com 703 (6,68%).

No domicílio, dos 4.022 flebotomíneos coletados, 4.012 (99,75%) foram distribuídos entre *Lu. intermedia* com 2.877 (71,53%) exemplares, *Lu. whitmani* com 946 (23,52%), *Lu. fisheri* com 159 (3,95%) e *Lu. migonei* com 30 (0,75%).

Os 1.008 flebotomíneos, dissecados para pesquisa de infecção natural por *Leishmania*, revelaram ausência destes protozoários, todavia, constatou-se em dois insetos a presença de microfíliarias.

Embora não fosse objeto da presente investigação, observações referentes à antropofilia das espécies existentes na região estudada indicaram grande número de flebotomíneos efetuando repasto sanguíneo no homem.

DISCUSSÃO

A fauna flebotomínica da Fazenda São Joaquim no Município de São Roque apresenta representantes de, pelos menos, 17 espécies, os quais já foram registrados em outras localidades do Estado^{4,5,3,8,7,11,16}. Com relação à *Lutzomyia misionensis*, desconhece-se sua presença em São Paulo, sendo comuns relatos em Minas Gerais e Argentina.

TABELA 4

Frequência de flebotomíneos coletados no Município de São Roque, Estado de São Paulo, distribuídos segundo local de coleta. Período de agosto/1987 a março/1989.

ESPÉCIE	DOMICÍLIO		MARGEM MATA		MATA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Lutzomyia whitmani</i>	946	23,52	5.234	49,76	84	15,19
<i>Lu. intermedia</i>	2.877	71,53	2.175	20,68	33	5,97
<i>Lu. fisheri</i>	159	3,95	2.250	21,39	351	63,47
<i>Lu. migonei</i>	30	0,75	703	6,68	13	2,35
<i>Lu. lloydi</i>	02	0,05	45	0,43	06	1,08
<i>Lu. alphabetica</i>	02	0,05	29	0,28	07	1,26
<i>Lu. edwardsi</i>	—	—	14	0,13	23	4,16
<i>Lu. firmatoi</i>	—	—	21	0,20	04	0,72
<i>Brumptomyia</i> sp	01	0,02	08	0,08	12	2,17
<i>Lu. pascalei</i>	—	—	09	0,08	03	0,54
<i>B. amarali</i>	—	—	07	0,07	04	0,72
<i>Pintomyia</i> sp	—	—	08	0,08	01	0,18
<i>Psychodopygus</i> sp	04	0,10	01	0,01	04	0,72
<i>B. nitzulescui</i>	—	—	04	0,04	02	0,36
<i>Lu. shannoni</i>	—	—	03	0,03	03	0,54
<i>Lu. misionensis</i>	—	—	04	0,04	—	—
<i>B. mangabeirai</i>	—	—	01	0,01	02	0,36
<i>B. cardosoi</i>	—	—	01	0,01	01	0,18
<i>Lu. termitophila</i>	01	0,02	01	0,01	—	—
<i>Lu. monticola</i>	—	—	01	0,01	—	—
Total	4.022		10.519		553	

Do total de 15.094 flebotomíneos coletados, 8.526 (56,49%) pertenciam ao sexo feminino, o que não constitui em novo achado, na medida em que indivíduos deste sexo são atraídos não somente pela isca de luz, como também, pela disponibilidade de fonte sanguínea¹¹. AGUIAR et alii, 1985¹, acreditam que o encontro de uma maioria de fêmeas não ingurgitadas fale a favor da nulidade da atração da isca luminosa. Já para o sexo masculino, observou-se menor coleta, 6.568 (43,51%) indivíduos. Embora para algumas espécies maior coleta ou única coleta tenha sido representada por machos (Tabela 2), este achado pode ser explicado não somente pela atração da isca luminosa, como também, pela atração exercida pela presença de fêmeas dessas espécies, que estando aptas a procurar e a efetuar o repasto sanguíneo estariam aptas, também, a efetuar a cópula.

Para GOMES & GALATI, 1987¹¹, a participação de fatores exógenos e endógenos explicariam tais achados. Poderia ser entendido como fator endógeno aquele relacionado à possível necessidade biológica de uma maior densidade de machos como forma de garantir a fecundação.

Ainda que tenha sido relativamente grande a diversidade de espécies coletadas (Tabela 2), 14.855 (98,41%) dos flebotomos pertenciam a quatro espécies: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. fischeri* e *Lu. migonei*. Esta predominância, quase absoluta, de poucas espécies com altas densidades em contraste com um número maior de espécies apresentando baixa densidade, coincide com resultados obtidos por AGUIAR et alii, 1985¹, no Parque Nacional da Serra dos Órgãos no Estado do Rio de Janeiro e por GOMES & GALATI, 1987¹¹, no Vale do Ribeira no Estado de São Paulo.

Pelos dados da Tabela 3, podemos constatar que os resultados obtidos em cada uma das armadilhas diferiu grandemente em número de insetos coletados, todavia, devemos ressaltar não ter sido objeto do presente estudo a comparação de eficiência de diferentes técnicas de coleta, o que teria exigido diferente metodologia para realização da investigação. Diferentes técnicas de coleta foram utilizadas no intuito de favorecer o reconhecimento de um maior número de espécies na área estudada.

É interessante observar que a armadilha luminosa possibilitou coleta de apenas 252 (1,6%) flebotomíneos, porém, foi capaz de revelar a quase totalidade das 17 espécies existentes na região. Apenas *Lu. misionensis*, *Lu. termitophila* e *Lu. monticola*, espécies que mostraram densidades insignificantes (Tabela 3), não foram coletadas na armadilha luminosa tipo Falcão modificada.

A utilização do aspirador tipo capturador de Castro permitiu o estabelecimento da relação de

predominância quanto à densidade, de cada uma das espécies encontradas.

Em relação a armadilhas luminosas, KILLICK-KENDRICK et alii, 1985¹⁴, estudando a atração da isca de luz de armadilha CDC, encontraram para *Phlebotomus ariasi* alcance não superior a dois metros.

No presente trabalho pareceu-nos evidente a importância da utilização de mais de uma técnica de coleta, na medida em que a armadilha luminosa mostrou-se eficiente para revelar a diversidade de espécies e o aspirador tipo capturador de Castro foi eficiente para indicar a diferença de densidade entre as várias espécies nos diferentes ambientes: florestal, de margem de mata e domiciliar.

O índice de positividade para pesquisa de infecção natural em flebotomíneos por protozoários do gênero *Leishmania* é muito baixo^{6,23}. Mesmo não tendo sido encontrados flebotomos infectados, os resultados expressos na Tabela 4, sobre a frequência dos flebotomíneos segundo local de coleta, permitem algumas considerações e especulações sobre a capacidade ou ao menos sobre o potencial vetorial de algumas espécies coletadas.

A Tabela 4 torna possível a constatação de uma verdadeira sucessão de espécies de flebotomíneos, segundo o ambiente em que os mesmos foram coletados.

Assim é que para cada um dos ambientes estudados, uma única espécie de flebotomíneo conteve a maioria dos insetos coletados, sendo *Lu. fischeri*, com 63,47%, a principal espécie no interior da mata; *Lu. whitmani*, com 49,76%, a predominante na margem de mata e, *Lu. intermedia*, com 71,53%, espécie com maior densidade no domicílio.

Em se considerando a densidade como indicador importante, ainda que não exclusivo, na determinação da capacidade vetorial dos flebotomíneos, é possível a especulação de que, diferentes espécies destes dípteros seriam importantes para a manutenção de *Leishmania* no ambiente endêmico em seus diferentes níveis, florestal e extra-florestal.

Ao contrário do verificado por VEXENAT et alii, 1986²² em Três Braços, no Estado da Bahia e por MAYRINK et alii, 1979¹⁷ em Caratinga, Minas Gerais, *Lu. whitmani* é mais abundante na margem de mata na região de São Roque, em São Paulo, com poucos exemplares encontrados no interior da mata e no domicílio. A constatação de um distinto comportamento, quanto às preferências de habitat, sugere a necessidade de amplos estudos no sentido de se verificar se *Lu. whitmani* constitui uma única espécie, com distribuição geográfica tão extensa ou se, de fato, representa um complexo de espécies de flebotomíneos.

Lu. intermedia, é a mais abundante das espécies ao nível domiciliar, o que está de acordo com observações de outros pesquisadores^{1,4,10,9,11,19}, tendo sido atribuído a esta espécie a capacidade de ultrapassar barreiras em ambiente aberto com o conseqüente estabelecimento de criadouros extra-florestais. Esta espécie apresentou-se em densidade tão alta que mesmo na ausência de exemplares naturalmente infectados, grande é o potencial vectorial por ela demonstrado, até porque mostrou, também, grande avidez em efetuar o repasto sanguíneo no homem.

Ao considerarmos a densidade populacional como indicador relevante da possibilidade de atuação como vetor, *Lu. fischeri* deveria merecer especial atenção, ao menos para manutenção do ciclo enzoótico no ambiente florestal, todavia, devemos mencionar que a incriminação deste flebotomíneo como transmissor do parasita ainda permanece por ser demonstrada.

CONCLUSÕES

Pelos estudos efetuados na região do Município de São Roque, no Estado de São Paulo, concluímos que:

- a) A fauna flebotomínica do município apresenta grande diversidade de espécies;

- b) A infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* deve ser muito baixa, indicando baixa disponibilidade de insetos em transmissão ativa;
- c) Conforme o ambiente estudado, existe predominância de uma espécie, em termos de densidade populacional, sobre todas as outras encontradas. *Lu. fischeri* predominou no interior da mata; *Lu. whitmani* predomina na margem da mata e *Lu. intermedia* no domicílio;
- d) Possivelmente a manutenção de *Leishmania* no ambiente endêmico seja exercida por diferentes espécies de flebotomos, no ambiente florestal e extra-florestal

AGRADECIMENTOS

Os autores manifestam gratidão aos colegas Carlos Roberto Elias, Rui Larosa e Antonio Silva Araújo, do Instituto Adolfo Lutz, que, com competência e dedicação atuaram nas atividades de coleta de flebotomíneos. Também à Diretoria e ao Corpo Técnico e Administrativo da Fazenda São Joaquim pelas facilidades concedidas para a realização deste projeto.

RIALA6/704

TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E.; CORRÊA, F.M.A.; MORAES, R. H.P.; VEIGA, R.M.O. & MARASSÁ, A.M. — American Cutaneous Leishmaniasis epidemiology in São Paulo State, Brasil. I — Sandfly fauna composition of São Roque County, Sorocaba region. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):25-00 1991.

ABSTRACT: The phlebotomine fauna study in endemic areas of American Cutaneous Leishmaniasis in São Paulo State, constitutes a part of a Leishmaniasis Service in Public Health Laboratory establishment project. In this paper we're describing the species found in São Roque County. The captures were carried out every week, between August/87 and March/89. 15,094 specimens of 17 different species were identified, although *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. fischeri* and *Lu. migonei* were dominant accounting for 98.42% of the whole collected. *Lu. whitmani* was predominant in the border of the forest (49.76%) while *Lu. fischeri* (63.47%) was more frequent within the forest and 71.53% of the *Lu. intermedia* were caught inside and out of houses. This specific diversity according to the environment considered would mean that different sandfly species are responsible for *Leishmania* maintenance depending on the ecosystem found in the endemic areas of this zoonosis.

DESCRIPTORS: Phlebotomine fauna, composition, American Cutaneous Leishmaniasis, São Roque County, São Paulo State.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, G.M.; VILELA, M.L.; SCHUBACK, P.A.; SOUCASAU, T. & AZEVEDO, A.C.R. — Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV — Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80: 465-82, 1985.
2. COMITÉ OMS D'EXPERTS SUR LA LUTTE CONTRE LES LEISHMANIOSES. Genève. 1989. *Lutte contre les leishmanioses*. Genève, OMS, 1990. 176 p. (Série de Rapports Techniques, 793)
3. FORATTINI, O.P. — *Entomologia Médica*. São Paulo, Ed. Edgard Blücher/ EDUSP, 1973. v. 4.
4. FORATTINI, O.P. — Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peri-domiciliares, no Estado de São Paulo. *Arq. Fac. Hig. Saúde públ. Univ. S. Paulo*, 7: 157-67, 1953.
5. FORATTINI, O.P. — Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Arq. Hig. Saúde públ.*, 24: 209-15, 1960.
6. FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.G.; RABELLO, E.X. & FERREIRA, O.A. — Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ. S. Paulo*, 6: 431-3, 1972.
7. FORATTINI, O. P.; RABELLO, E.X. & GALATI, E.A.B. — Novos encontros de flebotomíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência à *Lutzomyia longipalpis*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 10: 125-8, 1976.
8. FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; SERRA, O.P.; COTRIM, M.D.; GALATI, E.A.B. & BARATA, J.M.S. — Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 10: 31-43, 1976.
9. GOMES, A.C. — Mecanismos e significado epidemiológico da domiciliação. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 20: 385-90, 1986.
10. GOMES, A.C. — Observações ecológicas sobre *Psychodopygus intermedius* no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo Brasil. São Paulo, 1979. [Tese — Fac. Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
11. GOMES, A.C. & GALATI, E.A.B. — Aspectos ecológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5 — Estratificação da atividade espacial e estacional de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 467-73, 1987.
12. GRIMALDI, G.; TESH, R.B. & McMAHON-PRATT, D. — A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 41: 687-725, 1989.
13. JOHNSON, P.T.; McCONNELL, E. & HERTIG, M. — Natural infections of leptomonad flagellates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *Exp. Parasitol.*, 14: 107-22, 1963.
14. KILLICK-DENDRICK, R.; WILKES, T.J.; ALEXANDER, J.; BRAM, R.S.; RIOUX, J.A. & BAILLY, M. — The distance of attraction of CDC light traps to the Phlebotomine sandflies. *Ann. Parasitol. h. comp.*, 60: 763-67, 1985.
15. LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; RYAN, L.; PÓVOA, M.M. & ISHIKAWA, E.A.Y. — A *Leishmania* e as leishmanioses. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v.1, p.83-124.
16. MARTINS, A.V.; WILLIAMS, P. & FALCÃO, A.L. — *American Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)*. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1978. 195p.
17. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M.V.; DIAS, M.; VIANNA MARTINS, A.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, C.A., FALCÃO, A.R.; MELO, N.M. & FALCÃO, A.L. — Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 73: 123-37, 1979.
18. MORAES, R.H.P.; VEIGA, R.M.O. & MARASSÁ, A.M. — Adaptações em armadilha entomológica luminosa de sucção. *Mem. Inst. Butantan*, 51 (3): 79-84, 1989.
19. Rangel, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; AZEVEDO, A.C.R.; BARBOSA, A.F. & ANDRADE, C.A. — Flebotomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: 347-49, 1986.
20. SÃO PAULO. Secretaria de Economia e Planejamento. Departamento de Estatística. *Conheça seu município: região de Sorocaba*. São Paulo, 1974. v. 4, tomo 3.
21. SÃO PAULO. Secretaria de Economia e Planejamento. Coordenadoria de Ação Regional. *Diagnóstico: 4ª Região Administrativa*. São Paulo; SEP/CAR, 1973.
22. VEXENAT, J. A.; BARRETO, A.C.; CUBA CUBA, C. & MARSDEN, P.D. — Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. III — Fauna flebotomílica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: 293-301, 1986.
23. YOUNG, D.G.; MORALES, A.; KREUTZER, R.D.; ALEXANDER, J.B.; CORREDOR, A. & TESH, R. B. — Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *J. med. Entomol.*, 24 (5): 587-9, 1987.

Recebido para publicação em 3 de julho de 1990.

CONTROLE DE QUALIDADE INTERLABORATORIAL DOS MÉTODOS UTILIZADOS EM BIOQUÍMICA CLÍNICA, NA REDE DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ*

Heidi Pinto MARTINS**
Kioka ARIOSHI**
Luzia SHUNDO**
Mariza Menezes ROMÃO**
Regina C.A. STANCARI**
Regina Martins de OLIVEIRA**
Rosa M. M. FERREIRA**
Valter RUVIERI**

RIALA6/705

MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M.M.; STANCARI, R.C.A.; OLIVEIRA, R.M.; FERREIRA, R.M.M.; RUVIERI, V. — Controle de Qualidade Interlaboratorial dos Métodos Utilizados em Bioquímica Clínica, na Rede do Instituto Adolfo Lutz. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):31-36, 1991.

RESUMO: Este trabalho propõe a utilização de um "pool" de soro controle normal (SCN) e de um alterado (SCA) preparado pela adição de quantidades de substâncias químicas a serem analisadas. A concentração dos constituintes em cada "pool" foi estabelecida pela mensuração em diferentes laboratórios clínicos. Estes "pools" foram usados como um sistema controle para o estudo da precisão e exatidão, servindo para indicar a presença de erros, podendo alertar os analistas para falhas existentes na metodologia e aparelhagem.

DESCRIPTORIOS: Bioquímica Clínica; Soro Controle; Controle de Qualidade Interlaboratorial; Precisão e Exatidão.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de controle de qualidade fornecem tanto ao analista como ao clínico critérios objetivos para avaliar o andamento laboratorial^{3,5,13,14}. Distinguem-se duas facetas no controle de qualidade total:

INTERNO: análise diária de amostras controle para avaliar a precisão do método (Intralaboratorial).

EXTERNOS: análise de amostras controle recebidas de fonte externa para comparar o nível de exatidão em diferentes laboratórios (Interlaboratorial).

É recomendável que, antes de iniciar um programa de controle, salientar o seguinte:

a) pessoal técnico adequadamente treinado

b) equipamentos de boa procedência e com calibração e manutenção periódicas

c) reagentes de boa qualidade

d) coleta e conservação de amostra segundo metodologia requisitada

e) pipetadores e vidrarias limpos

f) existência de boas condições de trabalho

g) padrões e substâncias controles preparados utilizando-se substâncias puras (solutos e solventes) de composição conhecida (tais como NaCl puro e água destilada); ou particularmente substâncias purificadas (tais como enzimas e proteínas); ou produtos biológicos bem conservados (tais como soro humano ou bovino). Comumente, estes materiais são combinados ou tratados para obtenção de concentrações adequadas das substâncias a analisar.

* Realizado na Seção de Análises Clínicas Auxiliares e unidades regionais do Instituto Adolfo Lutz.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A seleção do material depende de julgamento do analista baseado no conhecimento dos efeitos do processo bioquímico, interferentes, concentrações analíticas desejadas, estabilidade, etc.

O soro humano pode ser obtido de doadores selecionados, por plasmáfereze ou como no presente trabalho de espécimes laboratoriais coletados sem contaminação microbiológica^{2,13}.

O objetivo primário no uso de materiais controles diários é alertar a equipe técnica para erros sistemáticos ou casuais. Contudo o aspecto mais crítico para qualquer programa controle não é o mecanismo usado para descobrir problemas potenciais mas ao contrário, as ações originadas como resultado destas informações.

Este trabalho descreve um sistema de controle que foi utilizado entre os laboratórios da rede Adolfo Lutz, elaborado pelos integrantes da Comissão Técnica de Bioquímica (D.O. n° 98, 28/5/88, p.21)

Inicialmente realizou-se monitoramento das principais reações bioquímicas de nossos laboratórios com a finalidade de mútuo auxílio na interpretação dos resultados obtidos nas mais diferentes regiões do Estado de São Paulo entretanto, com o decorrer das reuniões de discussão percebemos que, de fato, estava-se iniciando um programa de controle de qualidade interlaboratorial.

O maior problema dos integrantes do grupo se baseava no controle técnico das reações e na dificuldade de acesso a informações técnicas.

Nas primeiras reuniões foi discutido sobre qual o melhor caminho para conseguirmos uma uniformização técnica mas, com o decorrer do tempo, notamos não ser este o objetivo mais urgente. Os próprios elementos revelavam suas experiências com determinados tipos de reagentes elaborados por firmas (kits) e resultando daí uma seleção natural e um controle de qualidade dos próprios reativos adquiridos.

MATERIAL E MÉTODOS

Técnicas de controle:

Baseando nossos estudos na Provisional Recommendation on Quality Control in Clinical Chemistry^{4,14} estabelecemos que em cada laboratório regional integrante da Comissão haveria um responsável pelo preparo de soros controles normais (SCN) e alterados (SCA) para as diversas reações:

Marília — fosfatase alcalina
Pres. Prudente — glicose
Santo André — uréia
Sorocaba — transaminases
Araçatuba — triglicérides
Central — bilirrubinas, creatinina e ácido úrico

Os soros controles foram distribuídos aos integrantes do grupo que se incumbiram de realizar a determinação diária; os resultados foram posteriormente enviados ao laboratório central para a análise estatística.

Soros controles normais (SCN):

Os soros controles normais (SCN) foram coletados nos laboratórios da rede, formando-se um "pool". Foram excluídos os soros ictericos, os de composição organolépticas alteradas (hemolisados e lipêmicos) e com presença de contaminação bacteriana (fermentação). Diariamente, os soros coletados foram congelados em frascos de polietileno até se atingir o volume ideal. Após descongelamento e acerto do pH (7,2) foram distribuídos em frascos de vidro tipo penicilina, previamente autoclavados, e então congelados a -18°C . Não foram adicionados conservantes e/ou aditivos.

Soros controles alterados (SCA):

Os SCA para creatinina, ácido úrico, uréia e glicose foram preparados adicionando-se quantidades conhecidas de massa fria seguindo a mesma metodologia do preparo do SCN. No caso da fosfatase alcalina utilizou-se leite não pasteurizado adicionado ao SCN. Neste caso foi necessário escolher a amostra adequada de leite pois apesar da não pasteurização algumas não apresentaram um nível elevado de fosfatase alcalina. O SCA para bilirrubinas seguiu a seguinte técnica: foi preparada uma solução estoque contendo 5mg de bilirrubina (Sigma) e 6,25 ml de NaCO_3 a 1% (Merck). Esta solução após agitação foi mantida em frasco escuro ao abrigo da luz.

A solução de uso foi preparada no momento da reação da seguinte maneira: a 7 ml de SCN foi adicionado 1 ml de solução estoque de bilirrubina e 50 ml de Ácido Acético PA (Merck). Esta solução corresponde a cerca de 7 mg% de bilirrubina total. Por este método de preparo se obtém 90% de bilirrubina indireta.

Técnicas de doseamento:

Na tabela I encontramos os métodos e equipamentos utilizados, bem como as médias obtidas nos diferentes laboratórios da rede.

Para a determinação da glicemia foram utilizadas as reações da hexoquinase¹⁵ e glicoseoxidase¹¹. No caso da uréia dois métodos foram comparados urease¹² e diacetilmonoxima¹⁶.

Para o doseamento de triglicérides¹⁷, creatinina⁹, fosfatase alcalina¹, transaminases⁸ e bilirrubinas¹⁰ as técnicas foram as mesmas para todos os laboratórios da rede. Foi empregada metodologia diferente na determinação da uricemia, sendo que o laboratório central utilizou a uricase⁷ e os demais o tradicional método de Caraway⁶.

Análise estatística:

Foi utilizado o programa Stathgraphics versão 1.0 em microcomputador Prológica SP 16286, IBM compatível, sendo calculados a média, desvio padrão, limites e coeficiente de correlação.

Cuidados operacionais.

Quando da coleta de soros para o preparo dos "pools" deve-se levar em conta o alto risco a que está sujeito o operador, uma vez que o vírus da hepatite infecciosa é normalmente encontrado nas populações hospitalares e na rede de saúde pública. Bowers e colaboradores (2) recomendam extremo cuidado com soros humanos pois mais da metade dos soros encaminhados aos laboratórios são HBsAg positivos.

Além disso, também há o risco de contaminação com amostras de sangue que apresentam positividade para o HIV (vírus da imunodeficiência hu-

mana). Sugere-se a utilização de repipetadores automáticos, principalmente na hora de distribuir o soro controle em frascinhos e ao armazená-los no congelador sempre manter visível a targeta de "CUIDADOS ESPECIAIS".

RESULTADOS:

Os soros controles normal e alterado foram usados como parâmetros para controle da exatidão e precisão. Quando mais de 20% dos resultados se aproximam dos limites ± 2 d.p. (desvio padrão), configura-se a perda de exatidão que geralmente, é provocada por erros sistemáticos, como por exemplo, controles fora de especificação, reagentes mal preparados, variações de temperatura, não observância dos períodos de incubação dos métodos, leitura em comprimentos de onda fora dos recomendados, etc. A perda da precisão acontece quando a maioria dos pontos estão próximos dos

TABELA I

Resultados obtidos (média \pm dp) nas reações estudadas, nos diferentes laboratórios do Instituto Adolfo Lutz

	Central	Araçatuba	Bauru	Pres. Prudente	Sto. André	Campinas	Marília	Taubaté
Glicose	93,21 \pm 1,12	87,07 \pm 3,58	90,85 \pm 2,65	90 *	103 *	—	—	—
Normal (mg/dL)	Aba—100	Spectronic hexoquinase	Micronal glic. oxid.	Micronal glic. oxid.	Celm E210D glic. oxid.	—	—	—
Glicose	353,26 \pm 5,16	283,26 \pm 11,2	350,16 \pm 23,2	331 *	354 *	—	350*	—
Akterada (mg/dL)	Aba-100	Spectronic hexoquinase	Micronal glic. oxid.	Micronal glic. oxid.	Celm E210D glic. oxid.	—	Celm E210D glic. oxid	—
Triglicerídeos	444,04 \pm 11,59	428,61 \pm 27,7	443,61 \pm 16,7	421 *	353 *	—	439*	—
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic cinético	Micronal enzimático	Micronal pap	Celm E210D enzimático	—	Celm E210D enzimático	—
Uréia	90,41 \pm 2,04	85,00 \pm 6,76	96,79 \pm 3,21	87 *	84 *	—	—	—
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic urease	Micronal DAmoxima	Spectronic urease	Celm E210D urease	—	—	—
Bilir total	9,15 \pm 0,56	3,56 \pm 0,32	—	—	—	—	—	—
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic Malloy Ev	—	—	—	—	—	—
Bilir direta	1,01 \pm 0,17	0,10 \pm 0	—	—	—	—	—	—
Normal (mg/dL)	Aba—100	Spectronic Malloy Ev	—	—	—	—	—	—
Ácido úrico	19,74 \pm 0,51	19,57 \pm 1,08	—	—	—	19,98 \pm 0,86	—	13,99 \pm 1,19
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic uricase	—	—	—	Spectronic Caraway	—	Micronal Caraway
Creatinina	2,66 \pm 0,11	2,69 \pm 0,13	—	—	—	2,31 \pm 0,20	—	2,70 \pm 0,31
Alterado (mg/dL)	Spectronic Folin	Spectronic Folin	—	—	—	Spectronic Folin	—	Spectronic Folin
Fosf. alcalina	228,63 \pm 16,28	—	—	—	—	404,2 \pm 27,06	—	41,80 \pm 8,50
Alterado (U/L)	Aba—100	Abbott	—	—	—	Spectronic Reatoclin	—	Spectronic Reatoclin
TGP	—	—	800*	750*	—	—	780*	—
Alterado (U/L)	—	—	Micronal enzimático	Spectronic cinético	—	—	Celm E210D cinético	—
TGO	—	—	245*	152*	—	—	112*	—
Alterado (U/L)	—	—	Micronal enzimático	Spectronic cinético	—	—	Celm E210D cinético	—

* Médias enviadas ao laboratório central, não foi possível a comparação estatística.

MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M.M.; STANCARI, R.C.A.; OLIVEIRA, R.M.; FERREIRA, R.M.M.; RUVIERI, V. — Controle de Qualidade Interlaboratorial dos Métodos Utilizados em Bioquímica Clínica, na Rede do Instituto Adolfo Lutz. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):31-36, 1991.

TABELA II

Test t-Student e coeficiente de correlação obtidos nas determinações efetuadas nos laboratórios do IAL.

	coeficiente de correlação							
	Campinas vs Araçatuba	Campinas vs Central	Araçatuba vs Central	Bauru vs Araçatuba	Bauru vs Campinas	Araçatuba vs Bauru	Pres. Prud. vs Taubaté	Araçatuba vs
Glicose SCN	—	—	0,9863*	0,9946	0,9857	—	—	—
Glicose SCA	—	—	0,9857*	0,9658	0,9656*	—	—	—
Triglic SCA	—	—	0,9383*	0,9753	0,9436	—	—	—
Uréia SCA	—	—	0,9274*	0,9813*	0,9223*	—	—	—
FOSF ALC SCA	—	0,9112*	—	—	—	—	—	—
Ac úrico SCA	0,9336	0,9346	0,9916	—	—	0,9341	—	0,7111*
Creatin SCA	0,7136*	0,7310*	0,9318	—	—	—	0,9341	—
BIL TOT SCA	—	—	0,6734*	—	—	—	—	—
BIL DIR SCN	—	—	0,7643*	—	—	—	—	—
TGO SCA	—	—	—	—	—	—	0,4567	—
TGP SCA	—	—	—	—	—	—	0,5674*	—

* = Análise estatística significativa (Test t-Student, $p < 0,05$)

TABELA III

Estudo da Exatidão e precisão. Limites aceitáveis de Erro.

	Central	Araçatuba	Bauru	Campinas	Taubaté	Pres. Prudente	Sto. André	Marília
Glicose Normal	L 95-91 n 14 F 0	94-80 14 0	96-86 14 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Glicose Alterada	L 363-343 n 15 F 1	306-260 15 1	396-304 15 1	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Triglicerídeos Alterado	L 466-411 n 21 F 1	484-372 21 2	476-410 21 2	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Uréia Alterada	L 92-88 n 24 F 5	98-72 24 0	103-91 24 2	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Bilir. total Alterada	L 10-8 n 13 F 1	4,2-2,9 13 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Bilir. direta Normal	L 1,3-0,7 n 12 F 1	0,1-0,1 12 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Ácido úrico Alterado	L 21,7-17 n 34 F 0	21,7-17 10 0	— — —	22-28 10 0	16,8-11 10 0	— — —	— — —	— — —
Creatinina Alterada	L 2,9-2,4 n 9 F 0	2,9-2,4 10 0	— — —	2,7-1,7 10 0	1,9-2,5 10 6	— — —	— — —	— — —
Fosf. alcalina Alterada	L 261-197 n 22 F 1	— — —	— — —	458-350 10 0	59-25 10 1	— — —	— — —	— — —

L = Limite aceitável (média + 2dp a média - 2dp)

n = Número de amostras

F = Número de resultados fora do limite aceitável

limites ± 2 d.p. e poucos ao redor da média. Isto se deve a pipetagem inexata das amostras e padrões, agitação imprópria dos tubos, material sujo, falhas na calibração dos aparelhos (analisadores automáticos), etc. Bowers e colaboradores (2) sugerem que se depois de revistos todos os itens do método, o problema persistir, o operador e/ou o método devem ser trocados.

Na tabela I são apresentados os resultados obtidos nos diferentes laboratórios (média \pm d.p.), através dos vários métodos e aparelhos utilizados. Os resultados com * representam as médias enviadas ao laboratório central e não foi possível calcular o desvio padrão. Observa-se que os métodos enzimáticos são os que apresentam resultados dispar-

Na tabela II encontram-se a comparação dos métodos intralaboratoriais, o coeficiente de correlação e o resultado do teste "t" que permitiu estabelecer a significância ou não da comparação dos resultados. Foi escolhido o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na tabela III encontra-se os limites aceitáveis de erro estabelecidos pelo uso da média ± 2 d.p. e critério de Chevenet (5) o que nos permite analisar os métodos e estudar as tendências.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:

Os sistemas de controle estudados serviram como instrumentos de comparação entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios (precisão e exatidão).

A precisão foi estudada analisando-se os resultados diários enviados pelos analistas, sendo que a análise estatística foi feita por uma só pessoa. O soro controle foi processado como os desconhecidos (soro de paciente) para evitar vícios nos resultados.

Para os soros controles seguiu-se a mesma técnica na preparação evitando-se coletar soros lipêmicos, ictericos e/ou hemolisados que interferem na determinação de vários componentes bioquímicos. O acerto do pH para 7,2 torna-se necessário pela acidificação da amostra em função da perda

de CO_2 durante o congelamento.

Bowers e cols.(2) relacionam uma lista de interferentes nas diversas reações bioquímicas, e entre eles podemos citar: o efeito de outras substâncias redutoras no sangue e na urina diferentes da glicose na determinação desse componente pelos métodos de redução do cobre; também os efeitos físicos devem ser levados em conta tais como, a viscosidade e a tensão superficial da amostra; a hemodiluição em sangue de diabéticos descompensados; a liofilização pode produzir alterações na composição do material, podendo se verificar a diminuição da estabilidade das lipoproteínas. Os soros controles para bilirrubinas apresentam dois inconvenientes, a alteração pela luz (fotossensibilidade) e pela presença das proteínas séricas que podem alterar os resultados.

Os métodos químicos de doseamento mostraram pouca variação entre os resultados dos diferentes laboratórios da rede, ainda que os reativos sejam diferentemente preparados ou adquiridos de fonte externa. A determinação do ácido úrico foi a mais exata e precisa mesmo quando comparados os métodos enzimático (7) e o tradicional Caraway (6). O estudo da precisão indica que em três laboratórios analisados (Central, Campinas e Araçatuba) tivemos os mesmos limites (21,8 -17,8). Isto sugere que não existe método especial, mas que o conhecimento do método e dos equipamentos utilizados pode ser de grande ajuda no laboratório, para evitar erros sistemáticos e reagentes fora de controle.

Entre os diferentes métodos estudados, os que apresentaram variações mais significativas dos resultados foram os enzimáticos (fosfatase e transaminase) e/ou aqueles que sofrem alterações pelo próprio preparo dos controles (bilirrubinas). Os doseamentos das transaminases (GPT e GOT), bilirrubinas e fosfatase alcalina foram os que apresentaram as maiores instabilidades, tanto na determinação da precisão como da exatidão.

Conclui-se assim, que há necessidade de um tratamento especial para os soros controles que são utilizados para todas as reações. Um estudo incluindo o uso de aditivos especiais como por exemplo a glicerina será objetivo de próximas publicações.

RIALA6/705

MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M. M.; STANCAR, R. C. A.; OLIVEIRA, R. M. de; FERREIRA, R. M. M. e RUVIERI V. A interlaboratorial quality control of the utilized methods in clinical biochemistry, in the Adolfo Lutz Institute branch. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 31-36, 1991.

ABSTRACT: This paper describes the preparation of the serum normal pool and altered pool made from this base by volumetric additions of analyte. The concentration of each constituent in each pool is established from measurement in the several clinical laboratories.

This substance has been used like control system to study precision and accuracy and alerts one to the existence of problems. Moreover, such a system can provide the analyst with a valuable decision-making tool to help guide him in considering new methodology of instrumentation.

DESCRIPTORS: Clinical Biochemistry, Serum Control, Quality Control, Precision and Accuracy.

AGRADECIMENTOS

As colegas Marina Y.N. Oda, Lucia N. Castilho e Jusiara A.H. Gurgel pela valiosa colaboração neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H. & BROCK, M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164:321-9, 1946.
2. BOWERS, G.N.; BURNETT, R.W. & MCLOMB, R.B. Preparation and use of human serum control materials for monitoring precision in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 21(12):1830-6, 1975.
3. BUTTNER, J.; BORTH, R.; BOUTWELL, J.H. & BROUGHTON, P.M.G. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part I General principles and terminology. *Clin. Chem.* 22(4):532-40, 1976.
4. BUTTNER, J.; BORTH, R.; BOUTWELL, J.H.; BROUGHTON, P.M.G. & BOWYER, R.C. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 23(9):1784-9, 1977.
5. CALI, J.P. International criteria for reference materials. In: Quality Control in Clinical Chemistry. Transactions of the 6th international Symposium, Geneva, April 23-5, 1975. W.de Gruyter, Berlin — New York.
6. CARAWAY, W.T. Determination of uric acid in serum by a carbonate method. *Am. J. Clin. Pathol.* 25: 848 -55, 1965.
7. FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. & BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid / 4-aminophurason chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin. Chem.* 26 : 227-31, 1980.
8. HENRY, R.J.; CHIAMORI, N.; JOLUB, O.J. & BERKMAN, S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase and lactic deshydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.* 34: 381-90 1960.
9. LARSEN, K. Creatinine assay by a reaction kinetic principle. *Clin. Chim. Acta.* 41: 209-17, 1972.
10. MALLOY, H.T. & EVELYN, K.A. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119:481-90, 1937.
11. ROBIM, M. & SAIFER, A. Determination of glucose in biologic fluids with an automated enzymatic procedure. *Clin. Chem.* 11(9): 840-5, 1985.
12. SITLER, J.L. & ELSER, R.C. An improved method for the measurement of urea using a urease/glutamate dehydrogenase reagent and an Abbott ABA-100 analyser. *Clin. Chem.* 25(6):1125, 1979.
13. STAMM, D. Calibration and quality control materials. *Z. Klin. Chem Klin. Biochem.* 12: 137-45, 1974.
14. YOUNG, D.S. & MEARS, T.W. Measurement and standard reference materials in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* 14: 929-43, 1968.
15. WESTWOOD, A.; BUTLOCK, D.G. & WHITEHEAD, T.P. An examination of the hexokinase method for serum glucose assay using external quality assessment data. *Ann. Clin. Biochem.* 23: 92-6, 1986.
16. WYBENGA, D.C.; GIORGIO, J. & PILEGGI, G. Manual and automatic methods for urea nitrogen measurement in whole serum. *Clin. Chem.* 17: 891-5, 1971.
17. ZYBGENHORN, J. Improved method for enzymatic determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 21(11): 1627-9, 1975.

Recebido para publicação em 04 de julho de 1990.

NÍVEIS DE NITRITOS, NITRATOS E SORBATOS EM QUEIJS CURADOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO PAULO*

Neusa Vitoria V. SILVEIRA**
Helena Y. YABIKU**
Marilda DUARTE**
Mickiko Y. TAKAHASHI**
Elizabeth L. CHICOUREL**

RIALA6/706

SILVEIRA, N.V.V.; YABIKU, H.Y.; DUARTE, M.; TAKAHASHI, M. Y. & CHICOUREL, E. L. — Níveis de nitritos, nitratos e sorbatos em queijos curados, comercializados na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. A. Lutz*, 51 (1/2):37-40, 1991.

RESUMO: Foram realizadas determinações de nitritos, nitratos e sorbatos em 112 amostras de queijos curados adquiridos nos supermercados da cidade de São Paulo, correspondendo às diferentes formas: ralados, fatiados e em pedaços. Das 112 amostras analisadas, 81 (72,32%) não apresentaram nitritos e nitratos. Oito (7,14%) apresentaram presença de nitrato das quais uma estava acima do limite permitido pela legislação brasileira e nas demais 23 amostras, os níveis de nitritos e nitratos estavam abaixo do limite de detecção do método que é de 10 mg/kg (ppm). Em relação aos sorbatos, do total das amostras analisadas, 60 eram de queijo ralado e destas, 46 (76,66%) apresentaram níveis de sorbatos acima do limite permitido pela legislação brasileira.

DESCRITORES: nitritos, nitratos e sorbatos em queijos curados, determinação; queijos curados, determinação de nitritos, nitratos e sorbatos.

INTRODUÇÃO

Nitratos e nitritos são compostos que podem estar presentes na água, solo e nos vegetais; são também usados na forma de seus sais de sódio ou potássio como conservadores em alimentos processados para impedir a proliferação de microorganismos^{2,13,17}.

O nitrato ou nitrito de sódio ou potássio são utilizados na indústria de queijo de massa-cozida e semi-cozida para evitar o tufamento tardio que ocorre quando os queijos se encontram na câmara de maturação. O tufamento é na grande maioria causado por bactérias do gênero *Clostridium* tais como: *tyrobutyricum*, *butyricum*, *sporogenes* que na massa do queijo produzem gás carbônico e hidrogênio^{6,10,20,29}.

Um dos efeitos tóxicos do nitrato e nitrito que tem merecido atenção é a indução à metahemoglobinemia causada pela oxidação pelo nitrito da he-

moglobina à metahemoglobina que não pode realizar a função do transporte de oxigênio. A metahemoglobina corresponde a hemoglobina com o ferro no estado férrico^{8,12}. Esta doença é caracterizada pela dificuldade da formação de oxihemoglobina levando a hipóxia e ganha particular importância em crianças de pouca idade^{3, 5, 28}.

Outro efeito tóxico é a possibilidade da formação de compostos N-nitrosos, originados quando o nitrito reage com aminas. Foi constatada a incidência de câncer em animais de laboratório após a exposição a compostos N-nitrosos sugerindo assim a possibilidade de ocorrência deste mal em humanos^{16, 18, 22, 26, 27}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) fixa a ingestão diária aceitável (IDA), do nitrato em 3,70 mg/kg de peso corpóreo¹².

A legislação brasileira de aditivos intencionais permite a adição de nitratos e nitritos de sódio ou

* Realizado nas Seções de Laticínios e Aditivos do Instituto Adolfo Lutz, SP
** Do Instituto Adolfo Lutz

de potássio, associados ou não, em queijos, com exceção dos queijos frescos, na proporção de 0,005g/100g, no produto a ser consumido, expresso em ion nitrato⁴.

O ácido sórbico é empregado como conservador de alimentos principalmente na forma de seus sais de potássio, sódio ou cálcio, devido à maior solubilidade deste último em água^{13,19,25}. São eficientes no controle de mofos, leveduras e algumas bactérias, como agente antimicrobiano em grande variedade de alimentos, dentre eles os queijos. Por serem as bactérias lácticas resistentes aos sorbatos, seu emprego como agente antimicrobiano não é limitado em produtos onde a fermentação láctica é importante^{7,9,15,19}.

Estudos mostraram sua ação inibidora sobre o crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus sp.*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*, contra este último combinado ou não com nitrato^{7,23,24,25}.

Contudo, fatores do meio tais como pH, atividade de água, umidade, temperatura, atmosfera, carga microbiana presente, certos componentes do alimento e outros aditivos podem influenciar na atividade antimicrobiana do sorbato. Em ação conjunta com o conservador, estes fatores muitas vezes agem ampliando a ação antimicrobiana do mesmo^{7,19,23}. Todos estes fatores devem ser considerados quando do uso do ácido sórbico como agente antimicrobiano. Uma população inicial muito alta de mofos e algumas bactérias são capazes de degradar o ácido sórbico que perde com isso sua ação antimicrobiana. A seleção prévia de outros ingredientes, das condições de embalagem e estocagem otimizam o uso do sorbato e garantem a segurança do alimento^{19,23}.

O ácido sórbico é uma substância não tóxica, metabolizada pelo organismo humano de maneira semelhante aos ácidos graxos que ocorrem naturalmente nos alimentos. Sua meia vida no corpo humano é de 40 - 110 minutos, dependendo da dosagem e, sob condições normais, é completamente oxidado a gás carbônico e água^{9,19,25}. Nos Estados Unidos, o sorbato é considerado uma substância GRAS. (Generally Recognised As Safe) e seu uso é permitido para qualquer produto em que os conservadores podem ser adicionados¹⁹. Entretanto, recentes pesquisas tem indicado uma possível ação potencial genotóxica do ácido sórbico e seus sais, em animais de laboratório com resultados mutagênicos²¹.

Sua ação antimicrobiana está baseada na inibição de vários sistemas enzimáticos e de suas reações, inibindo com isso o metabolismo e o crescimento de certos microorganismos. Contudo, um

mecanismo único que seja responsável pela ação antimicrobiana do sorbato não foi ainda relatado e estes mecanismos diferem para bactérias, leveduras e mofos²⁵.

Segundo a legislação brasileira a presença do ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio são permitidos no limite de 0,10g/100g na crosta dos queijos, bem como 0,20g/100g em queijos ralados e 0,10g/100g em queijos fatiados pré-embalados e em queijos pasteurizados e fatiados⁴.

Neste trabalho foram determinados os teores de nitritos, nitratos e sorbatos em queijos curados com a finalidade de se obter informações atualizadas sobre o uso desses aditivos e verificar o cumprimento da legislação vigente no país.

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 112 amostras de queijos curados, de 38 marcas e 12 tipos diferentes comercializados na cidade de São Paulo no período de março de 1988 a março de 1990. A escolha do estabelecimento onde foram adquiridas as amostras foi feita ao acaso. No laboratório, as amostras foram numeradas e quando não analisadas no dia de sua aquisição foram guardadas em geladeira.

A amostragem, quando do queijo em pedaço, foi feita retirando-se de diferentes partes do queijo, uma porção sem a crosta que, em seguida, foi ralada em ralador doméstico.

Os nitratos foram quantificados espectrofotometricamente após redução a nitritos em coluna de cádmio, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁴ após uma prévia desproteínização, segundo o método citado por HAMILTON¹¹ onde se utiliza o sulfato de zinco como precipitante em meio básico. Os nitritos foram quantificados espectrofotometricamente, através da reação com alfa-naftol²³.

A análise de sorbatos foi realizada também segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁴, através de determinação espectrofotométrica após destilação com arraste de vapor de água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 112 amostras analisadas, 81 (72,32%) não apresentaram nitrito e nitrato; 8 (7,14%) apresentaram presença de nitratos, das quais uma estava acima do limite permitido pela legislação brasileira (FIGURA 1) e nas demais 23 amostras, os níveis de nitrito e nitrato estavam abaixo do limite de detecção do método, que é de 10 mg/kg (ppm).

Esses baixos níveis encontrados podem ser explicados devido à alta solubilidade na água por parte destes conservadores, sendo assim eliminados em sua grande parte no soro do leite. Somente uma pequena parte fica adsorvida na superfície da micela da caseína coagulada¹.

Resultado semelhante não foi encontrado quanto aos teores de sorbatos nas amostras analisadas.

Do total de 112 amostras analisadas, 60 eram de queijo ralado e dessas, 40 (76,66%) apresentaram níveis de sorbato acima do limite permitido pela legislação brasileira (FIGURA 2).

Não foi detectada a presença de sorbatos nas amostras de queijo em pedaço possivelmente devido a retirada de crosta dos mesmos durante a preparação da amostragem.

CONCLUSÃO

Os baixos níveis de nitritos e nitratos encontrados nos queijos curados, indicam que produtores fazem uso desses conservadores, porém, cumprem os limites previstos pela legislação brasileira.

Quanto aos altos níveis de sorbatos encontrados, embora seja um aditivo GRAS, não podem ser tolerados. Os limites previstos pela legislação vigente são suficientes para a conservação do queijo, se esses forem produzidos em condições sanitárias adequadas e com matéria prima de boa qualidade.

Os limites desses aditivos adotados pela legislação brasileira são os recomendados pelo CCFA (Committee Codex Food Additives).

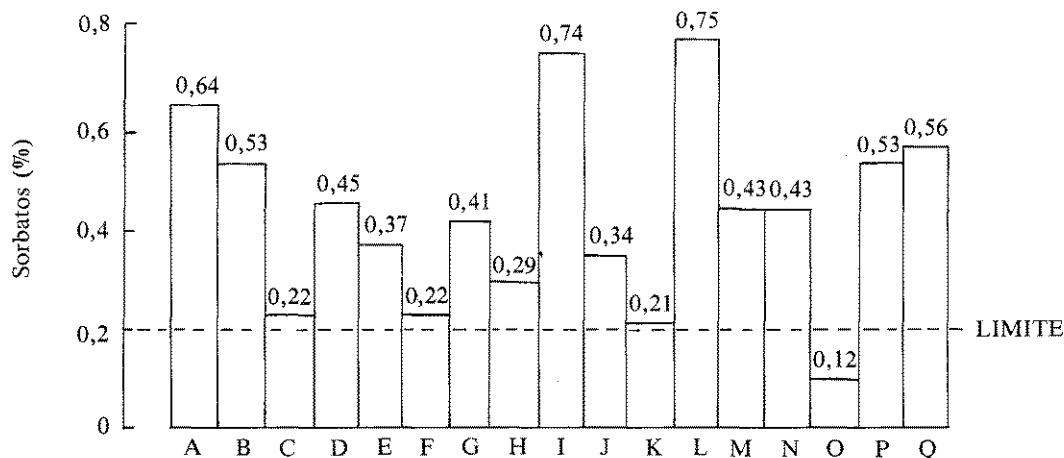


FIGURA 1. Valores médios de sorbatos em queijos ralados de 17 marcas

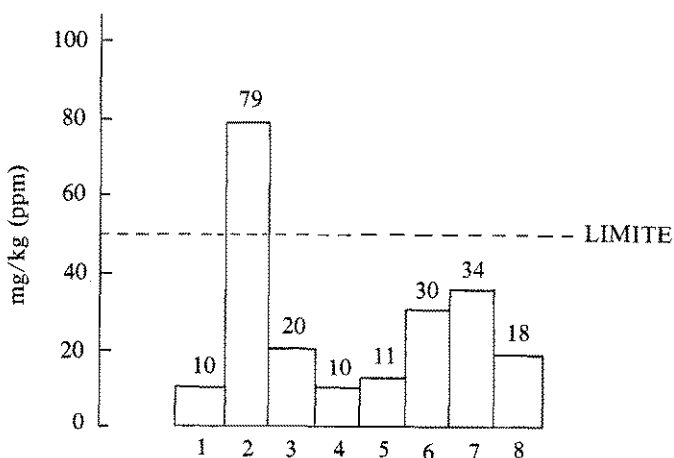


FIGURA 2. Níveis de nitratos (expressos em íon nitrito) em queijos curados

SILVEIRA, N. V. V.; YABIKY, H. Y.; DUARTE, M.; TAKAHASHI, M. Y. & CHICOUREL, E. L. — Nitrite, nitrate and sorbate levels in cured cheese sold in São Paulo city. *Rev. Inst. A. Lutz*, 51 (1/2): 37-40, 1991.

ABSTRACT: 112 samples of cured cheese such as crumbled, sliced and pieces sold in markets of the city of São Paulo, were analysed for their nitrite, nitrate and sorbate contents. From these samples analysed, 81 (72,32%) showed neither nitrate nor nitrite content. Eight samples (7,14%) showed a level of nitrate and one of them was above of the tolerated and the levels of nitrite and nitrate of the other 23 samples were below than 10 mg/kg (sensitivity limit of the analytical method employed). From the total of cheese analysed, 60 were crumbled and 46 (76,66%) of them showed content of sorbate above the tolerated level.

DESCRIPTORS: nitrite, nitrate and sorbate in cured cheese, determination; cured cheese, determination of nitrite, nitrate and sorbate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, L. R.; COSTA, L. C. G. & FURTADO, M. M. — Influência da adição de nitrato de sódio ao leite destinado à fabricação de queijo prato nos teores de NO_3 e NO_2 do soro e do queijo. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, 41 (247): 35-6, 1986.
2. ARAUJO, A. C. P. & MÍDIO, A. F. — Nitratos y nitritos en alimentos infantiles industrializados y caseros. *Alimentaria*, 27 (209): 69-75, 1990.
3. ARAUJO, A. C. P. & MÍDIO, A. F. — Nitratos, nitritos e compostos N-nitrosos em alimentos: onde está o problema? *Cien. Cult.*, 41 (10): 947-56, 1989.
4. BRASIL, Leis, decretos, etc., Resolução nº 4/1988 do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 19 dez. 1988, Seção 1, p. 24718. Aprova a revisão das tabelas I, III, IV e V, referentes a aditivos intencionais e anexos I, II, III, IV e VII, todos do decreto 55.781 de 26.03.65.
5. COMROE, J. H. — Resposta ao oxigênio e ao déficit de O_2 . In: _____ *Fisiologia da respiração*; trad. por H. M. Tisenberg e W. A. Zin. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. p. 31-52.
6. EL-GENDY, S. M.; NASSIB, T.; ABED-EL-GELLEL, & HANAFY, N. E. H. — Survival and growth of clostridium species in the presence of hydrogen peroxide. *J. Food Prot.*, 43 (6): 431-2, 1980.
7. EL-SHENAWY, M. A. & MARTH, E. H. — Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J. Food Prot.*, 51 (11): 842-7, 1988.
8. FARRÉ ROVIRA, R. & FRIGOLACÁNOVES, A. — Nitratos: aspectos bromatológicos, toxicológicos y analíticos. *Alimentaria*, 24 (179): 15-21, 1987.
9. GAVA, A. J. — Emprego de conservadores em alimentos. *Bol. SBCTA*, 18 (3): 183-94, 1984.
10. GRAY, J. I.; IRVINE, D. M. & KAKUDA, Y. — Nitrates and N-nitrosamines in cheeses. *J. Food Prot.*, 42 (3): 263-72, 1979.
11. HAMILTON, J. E. — Collaborative study of the colorimetric determination of nitrate and nitrite in cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59 (2): 284-8, 1976.
12. HERRADOR, M. A. & ASUERO, A. G. — Determination de aniones traze en leche IV. Nitratos y nitritos: aspectos toxicológicos y bromatológicos. *Alimentaria*, + = (175): 35-9, 1986.
13. HERRADOR, M. A. & ASUERO, A. G. — Nitratos y nitritos em leche (parte 2). *Alimentaria*, 23 (176): 43-9, 1986.
14. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. p. 96-100, 103-4.
15. JAY, James M. — Food preservation: In: _____ *Modern food microbiology*. 3ª ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1986. p. 257-96.
16. LARA, W. H.; TAKAHASHI, M. Y. & SILVEIRA, N. — Determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38 (2): 161-6, 1978.
17. LARA, W. H.; TAKAHASHI, M. Y. & YABIKY, H. Y. — Níveis de nitratos em beterraba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44 (2): 109-13, 1984.
18. LARA, W. H. & TAKAHASHI, M. Y. — Níveis de nitratos em hortaliças. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42 (1/2): 53-7, 1982.
19. LIEWEN, M. B. & MARTH, E. H. — Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: a review. *J. Food. Prot.*, 48 (4): 364-75, 1985.
20. MORAES, J. M. — Influência de diferentes concentrações de nitratos e nitritos na inibição de esporulados anaeróbios gasógenos do leite. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, 36 (215): 21-3, 1981.
21. MUNZNER, R.; GUIGAS, C. & RENNER, H. W. — Examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential. *Food Chem. Toxicol.*, 28 (6): 397-401, 1990.
22. NITRATE, nitrite and nitroso compounds in foods. *Food Technol.*, 41(4):12-36, 1987.
23. RONNING, I. E. & FRANK, H. A. — Grow response of putrefactive anaerob 3679 to combinations of potassium sorbate and some common curing ingredients (sucrose, salt, and nitrite), and to noninhibitory levels of sorbic acid. *J. Food Prot.*, 51 (8): 651-4, 1988.
24. SOFOS, J. N. & BUSTA, F. F. — Alternative to use of nitrite as an antibotulinal agent. *Food Technol.*, 34 (5): 244-51, 1980.
25. SOFOS, J. N. & BUSTA, F. F. — Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food. Prot.*, 44 (8): 614-47, 1981.
26. SWANN, P. F. — The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 26: 1761-70, 1975.
27. TAVARES, M.; ZANELATTO, A. M.; CARVALHO, J. B.; BACCETTI, L. B.; TAKAHASHI, M. Y. & AUED, S. — Determinação de nitritos e nitratos em linguiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47 (1/2): 5-10, 1987.
28. WALKER, A. — Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 26: 1735-42, 1975.
29. ZERFIRIDIS, G. K. & MANOELKIDIS, K. S. — Contents of nitrates and nitrites in some Greek and imported cheeses. *J. Food Prot.*, 44 (8): 576-9, 1981.

Recebido para publicação em 08 de agosto de 1990.

USO DE AMOSTRA CONTROLE NA AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE EQUIPAMENTOS SEMI-AUTOMATIZADOS EM HEMATOLOGIA LABORATORIAL: UMA PROPOSTA DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA.

Marcos Antônio Gonçalves MUNHOZ**
Elena Yoko GUSHIKEN**
Nilce Rodrigues PACHECO**
Silvana Beatriz CAMPA**
Cecília KITAMURA**
Raymundo Soares de AZEVEDO NETO***

RIALA6/707

MUNHOZ, M. A. G.; GUSHIKEN, E. Y.; PACHECO, N. R.; CAMPA, S. B.; KITAMURA, C. & AZEVEDO NETO, R. S. — Uso de Amostra Controle na avaliação da Reprodutibilidade de Equipamentos Semi-automatizados em Hematologia Laboratorial: Uma proposta de Controle de Qualidade para Laboratórios de Saúde Pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):41-45, 1991.

RESUMO: A Seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, utiliza na calibração de seus equipamentos hematológicos semi-automatizados padrões comerciais nacionais e internacionais, padrões preparados pela própria seção, e uma amostra de sangue humano triada da rotina diária, usada como padrão secundário. A ênfase do presente trabalho é voltada para a utilização dessa amostra como técnica de controle de qualidade em hematologia, mais especificamente para o controle diário da reprodutibilidade de equipamentos semi-automatizados. Esta técnica de amostra controle é aplicada em nossa seção desde 1987, e os resultados obtidos são apresentados em função dos coeficientes de variação encontrados para cada uma das determinações estudadas, e estas relacionadas à técnica manual correspondente através de regressão linear.

DESCRITORES: Controle de qualidade, hematologia, amostra controle, equipamentos automáticos.

INTRODUÇÃO

Os laboratórios de Saúde Pública incluem no conjunto de suas funções o monitoramento das condições patológicas que afetam uma determinada população alvo. Esta característica de acompanhamento exige que valores obtidos através de procedimentos analíticos diferentes sejam comparáveis a qualquer momento, sendo portanto fundamental a utilização de técnicas de controle de qualidade para garantir a reprodutibilidade dos processos laboratoriais.

A análise hematológica vem adquirindo um perfil cada vez mais objetivo, valendo-se de métodos mais quantitativos do que qualitativos, sem entretanto desprezar os conhecimentos morfológicos tradicionais, importantíssimos no diagnóstico hematológico. Dentre estes avanços está a contagem de células sanguíneas através de equipamentos eletrônicos, alguns realizando inclusive contagens diferenciais de Leucócitos por métodos automatizados^{3,12}.

Os contadores celulares, automatizados ou semi-

* Realizado na Seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central e na Disciplina de Informática Médica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

automatizados, têm uma grande capacidade de produção associada a uma reprodutibilidade muito boa. Porém há que se considerar a necessidade de um rigoroso controle dos procedimentos que culminam com a obtenção de resultados numéricos.

Diante da possibilidade não desprezível de falhas no processo analítico, impõe-se um controle eficiente do processo que aponte os erros que porventura aconteçam.

Para tanto existem técnicas de controle de qualidade aplicáveis às contagens celulares automatizadas: padrão de micropartículas de látex, padrão de sangue de aves, padrão de sangue humano ou de outro mamífero^{7,13,19} e amostra controle.

Os padrões comerciais têm um custo operacional relativamente alto quando comparados à amostra controle, ficando assim reservados à calibração freqüente dos equipamentos.

Já a amostra controle é usada nos procedimentos ao longo da rotina e como padrão secundário na calibração diária dos aparelhos eletrônicos, em comparação com contagens celulares em câmara de Neubauer e dosagens de hemoglobina em espectrofotômetro calibrado¹⁶.

Autores como BRITTON⁴, DAVIDSOHN & NELSON⁸, MIALE¹⁵ E PLATT¹⁷, descrevem em detalhes os principais erros observados nas contagens celulares em câmara de Neubauer, e apresentam alternativas que minimizam esses erros.

As dosagens de hemoglobina pelo método manual colorimétrico de referência^{21,22} apresentam facilidades técnicas de execução e boa reprodutibilidade.

O objetivo deste trabalho é analisar o desempenho da técnica de amostra controle em laboratório de hematologia, tendo em vista uma proposta de controle de qualidade factível para nossa realidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostra de sangue humano triada da rotina diária (5,0 ml de volume colhido em tubo a vácuo, com EDTA), com valores hematimétricos dentro da faixa de normalidade para adultos sadios, denominada amostra controle.

2. Determinação do valor do microhematócrito da amostra controle em tubo capilar, através de microcentrifuga¹⁰.

3. Confecção de duas extensões de sangue da amostra controle em lâminas de vidro, coradas

com corante panóptico (Leishman)¹⁴.

4. Contagem em duplicata de eritrócitos e leucócitos da amostra controle, em Câmara de Neubauer modificada¹. Cálculo da média aritmética.

5. Dosagem em triplicata da hemoglobina da amostra controle pelo método da cianometahemoglobina^{21,22} em espectrofotômetro calibrado¹⁶. Cálculo da média aritmética.

6. As médias aritméticas dos valores manuais foram consideradas como "valores reais" (padrão secundário).

7. Contagens de eritrócitos, leucócitos e dosagem de hemoglobina da amostra controle, através de contador celular e hemoglobinômetro semi-automatizados*, em 11 replicatas. Cálculo das médias aritméticas (\bar{x}), desvios padrão (SD), e coeficientes de Variação (CV), desses valores replicados⁹.

Valores replicados muito distantes da média aritmética ou além dos limites aceitáveis de erro, devem ser desprezados para novo cálculo da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação^{2,5,18}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

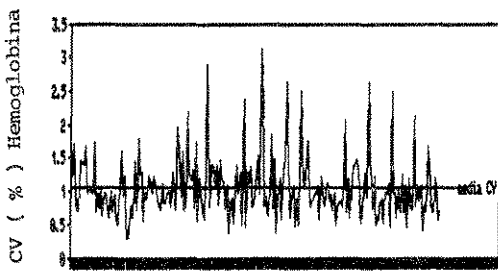
A amostra controle é um recurso de aplicação simples no controle de qualidade em laboratório de hematologia, quer para avaliação de contagens de células sanguíneas, quer para a dosagem de hemoglobina. Reúne as vantagens de custo operacional baixo e de ser o próprio objeto de análise.

Um bom critério para se verificar a precisão de equipamentos automáticos e semi-automáticos ao longo do tempo é o coeficiente de variação calculado a partir de 11 replicatas da amostra controle para as contagens de eritrócitos, leucócitos, e dosagens de hemoglobina. Em 30.063 determinações realizadas por nós num período de 3 anos, admitimos como coeficiente de variação máximo para essas análises o valor de 5%, sendo que é possível estabelecer uma meta mais exigente à medida que se domine as técnicas de controle de qualidade e que se aprimora a reprodutibilidade dos equipamentos.

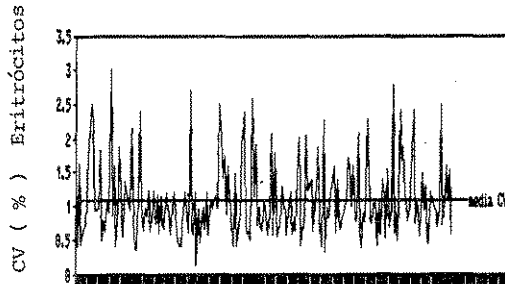
Podemos observar que as amostras controle quando estudadas em aparelho calibrado diariamente, apresentaram Coeficientes de Variação menores que 5% em qualquer análise realizada, como mostram as Figuras 1, 2 e 3.

Tais dados demonstram um desempenho eficiente do aparelho e estabelecem para o Controle de

* SYSMEX Microcoulter, modelo CC 110



dias de rotina



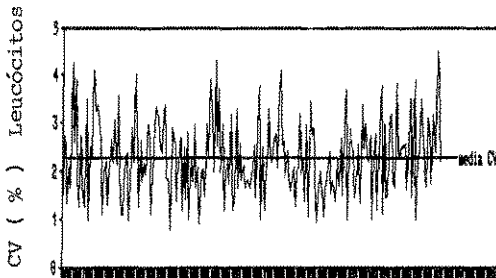
dias de rotina

FIGURA 1

Representação gráfica dos Coeficientes de Variação das dosagens de Hemoglobina realizadas em aparelho semi-automatizado, no período de 3 anos.

FIGURA 2

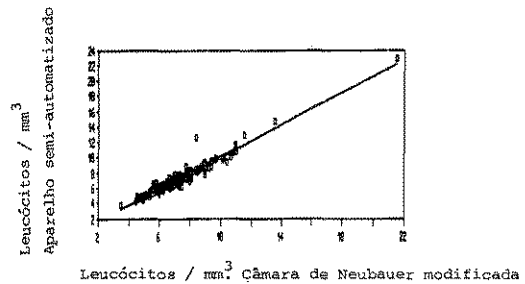
Representação gráfica dos Coeficientes de Variação das contagens de Eritrócitos realizadas em aparelho semi-automatizado, no período de 3 anos.



dias de rotina

FIGURA 3

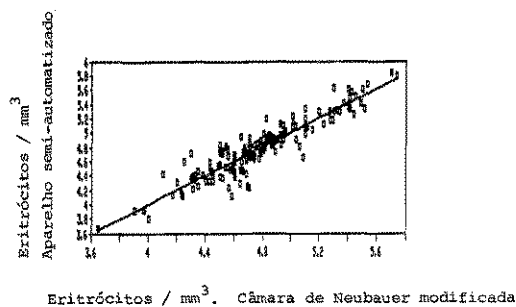
Representação gráfica dos Coeficientes de Variação das contagens de Leucócitos realizadas em aparelho semi-automatizado, no período de 3 anos.



Leucócitos / mm³ Câmara de Neubauer modificada

FIGURA 4

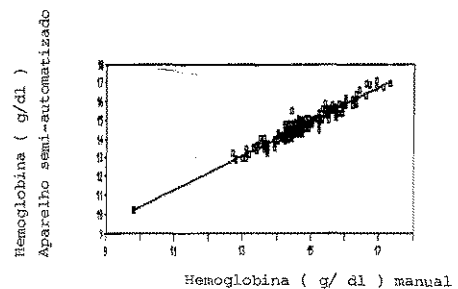
Gráfico de Regressão linear das contagens de leucócitos obtidas em aparelho semi-automatizado e Câmara de Neubauer modificada, no período de 3 anos. $r = 0,966637$



Eritrócitos / mm³. Câmara de Neubauer modificada

FIGURA 5

Gráfico de Regressão linear das contagens de eritrócitos obtidas em aparelho semi-automatizado e Câmara de Neubauer modificada, no período de 3 anos. $r = 0,928183$



Hemoglobina (g/dl) manual

FIGURA 6

Gráfico de Regressão linear das dosagens de Hemoglobina obtidas em aparelho semi-automatizado e pelo método manual da Cianometahemoglobina, no período de 3 anos. $r = 0,96579$

Qualidade valores limítrofes, que quando superados indicam a presença de erros que devem ser corrigidos imediatamente.

Os gráficos de Regressão Linear das contagens de leucócitos, eritrócitos e dosagens de hemoglobina dos métodos manuais e automatizados apresentaram Coeficientes de Regressão²⁰ próximos a 1, demonstrando a boa correlação entre estes métodos, ilustrada nas Figuras 4, 5 e 6.

O valor do microhematócrito é utilizado como controle empírico das contagens de eritrócitos e dosagens de hemoglobina manual e por aparelho¹¹

Os esfregaços de sangue da amostra controle, quando examinados em microscópio óptico comum, orientam quanto ao tamanho das hemácias, detectam a presença eventualmente excessiva de grandes plaquetas que podem falsear o valor global de leucócitos, e informam o número aproximado de leucócitos/mm³ ⁶.

Valores replicados obtidos por contagens automatizadas, que eventualmente se distanciam demasiadamente da média aritmética ou fiquem fora dos limites aceitáveis de erro ($\bar{X} \pm 2.SD$), podendo elevar consideravelmente o valor do coeficiente de variação, devem ser desprezados. Com a retirada desses valores deslocados ao acaso, recalculamos os novos valores da média aritmética, do desvio padrão e do coeficiente de variação^{2,5,18}.

Segundo EBNER*, deve-se desprezar no máximo 1 valor em 11, pois valores deslocados ao acaso não devem ultrapassar de 10% do total de replicatas. O aparecimento de mais de um valor deslocado implica na necessidade de medidas corretivas específicas.

Sugerimos que as médias aritméticas dos valores replicados da amostra controle, obtidos no aparelho, não variem mais do que 3% dos "valores reais" dos leucócitos e eritrócitos, e não mais do que 1% do "valor real" da hemoglobina, obtidos pelos métodos manuais. Variações acima dessas porcentagens não devem ser aceitas. É preciso determinar novamente os valores manuais e automatizados para efeito de nova calibração do aparelho.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com este trabalho, é possível estabelecer uma proposta de controle de qualidade interno em laboratório de hematologia, para contagem de células e dosagem de hemoglobina em equipamentos automatizados, nos seguintes termos:

1. Triar da rotina diária uma amostra controle (padrão secundário).
2. Com esta amostra, confeccionar dois esfregaços de sangue e corá-los com corante panóptico.
3. Determinar manualmente com esta amostra:
 - o hematócrito;
 - o número de eritrócitos e leucócitos em duplicata;
 - o valor da hemoglobina em triplicata.

Calcular as médias aritméticas e considerá-las como "valores reais".

4. Determinar no aparelho, através de 11 replicatas desta amostra, os valores de eritrócitos, leucócitos e hemoglobina. Calcular a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Considerar o aparelho reprodutivo quando os coeficientes de variação das dosagens de hemoglobina, contagens de eritrócitos e leucócitos não ultrapassarem o limite de 5%.

5. Com o aparelho calibrado, iniciar a rotina e a cada 20 amostras de pacientes, introduzir a amostra controle para detectar eventual perda da calibração do equipamento.

6. Verificar a exatidão dos aparelhos com o uso diário de padrões primários.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários das Seções de Recepção & Colheita de Material e de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pela enorme colaboração prestada na coleta do material e nas análises de Controle de Qualidade.

RIALA6/707

MUNHOZ, M. A. G.; GUSHIKEN, E. Y.; PACHECO, N. R.; CAMPA, S. B.; KITAMURA, C. & AZEVEDO NETO, R. S.; — Using Control Sample for the Evaluation of Automatic Equipment Reproducibility in the Hematology Laboratory: A Proposition for Quality Control in Public Health Laboratories. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):41-45, 1991.

* EBNER, P. A. R. — Comunicação pessoal. Seção de Controle de Qualidade do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

MUNHOZ, M. A. G.; GUSHIKEN, E. Y.; PACHECO, N. R.; CAMPA, S. B.; KITAMURA, C. & AZEVEDO NETO, R. S. — Uso de Amostra Controle na avaliação da Reprodutibilidade de Equipamentos Semi-automatizados em Hematologia Laboratorial: Uma proposta de Controle de Qualidade para Laboratórios de Saúde Pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):41-45, 1991.

ABSTRACT: The automatic equipment for cell counting and hemoglobin dosage has its calibration made by the staff of the Hematology Section of the Pathology Division in the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil) using international and national standards, standards prepared in the section and a secondary standard (a sample from the routine). This paper presents our experience with this sample as a quality control technique in hematology, specially for the daily monitoring of the automatic equipment reproducibility. The control sample technique has been applied in our section since 1987, and the results are discussed through the variation coefficient found for each analysis studied. A regression is made between the manual and the automatic technique.

DESCRIPTORS: quality control, hematology, control sample, automatic equipment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, F. J. & SILVERTON, R. E. — *Introduction to medical laboratory technology*. 6th ed. London, Butterworths, 1985. p. 320-4.
2. BARNETT, R. N.; GAMBINO, S. R.; AMENTA, J. S.; HOFFMAN, R. G. & SKENDZEL, L. P. — *Statistical methods in the clinical laboratory*. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1968. p. 69-70, 82, 86.
3. BAUER, J. D. — *Clinical laboratory methods* 9th. ed. St. Louis, C. V. Mosby, 1982, p. 180-2.
4. BRITTON, C. J. C.; HAYHOE, F. G. J. & TOVEY, G. H. — *Disorders of the blood: diagnosis, pathology, treatment, technique*. 9th ed. London, J. A. Churchill, 1963. p. 727-8.
5. BUENO, W. A. & DEGREVE, L. — *Manual de laboratório físico-química*. São Paulo, McGraw-Hill, 1980. p. 10-4.
6. CARVALHO, W. F. — *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia*. 2ª ed. Belo Horizonte, Coop. Ed. Cult. Médica, 1978. p. 228.
7. DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. — *Practical haematology*. 5th. ed. London, Churchill Livingstone, 1975, p. 58-60.
8. DAVIDSOHN, I. & HENRY, J. B. — *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. 6ª ed. Barcelona, Salvat Editores, 1978. p. 122-4, 127-8.
9. DORSEY, D. B.; DIGGS, L. W.; SHANBERGE, J. N. & RIGAL, R. D. — *Hematology*. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1968, p. 18-20.
10. EVATT, B. L.; LEWIS, S. M.; LOTHE, F. & McARTHUR, J. R. — *Anemia: fundamental diagnostic hematology*. Atlanta, CDC; Geneva, WHO, 1983. p. 67-70. (CDC Lab Manual).
11. GULATI, G. & HYUN, B. H. — Quality control in hematology. *Clin. Lab. Med.* 6 (4): 675-88, 1986.
12. HALL, R. & MALIA, R. G. — *Medical laboratory haematology*. London, Butterworths, 1984. p. 191-203.
13. LEWIS, S. M. — El plan internacional de la OMS de evaluación externa de la calidad en hematología. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 106(5):407-19, 1989.
14. LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J. & CANÇADO, J. R. — *Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação*. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. p. 416-9.
15. MIALE, J. B. — *Laboratory medicine hematology*. 6th. ed. St. Louis, C. V. Mosby, 1982. p. 370-1, 862-4.
16. MOURA, R. A. A.; et alii — *Técnicas de laboratório*. 3ª ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1987. P. 13-4.
17. PLATT, W. R. — *Atlas de hematologia en color*. Barcelona, Editorial Jims, 1972. p. 33-4, 72-5.
18. RAPHAEL, S. S. — *Lynch's medical laboratory technology*. 4th. ed. Tokyo, Igaku — Shoin/Saunders, 1983. p. 47-8.
19. SONNENWIRTH, A. C. & JARETT, L. — *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 8th. ed. St. Louis, C. V. Mosby, 1980. p. 631-2.
20. STRUFALDI, B. — *Obtenção de amostras, espectrofotometria, controle de qualidade*. São Paulo, McWill Ed, 1981. p. 100-5.
21. VAN ASSENDELFT, O. W.; HOLTZ, A. H. & LEWIS, S. M. — *Recommended method for the determination of the haemoglobin concentration of blood*. Geneva, WHO, 1984. p. 1-12. (WHO/LAB/84.10).
22. WINTROBE, M. M. — *Hematologia clínica*. 4ª ed. Buenos Aires, Inter-Médica, 1979. p. 113-5.

Recebido para publicação em 21 de agosto de 1990.

IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COMPOSTAS BRASILEIRAS DE EMPREGO MEDICINAL*

Luzia Ilza Ferreira JORGE**
Ulysses PEREIRA**
Augusta Mendes da SILVA**

RIALA6/708

JORGE, L. I. F.; PEREIRA, U. & SILVA, A. M. — Identificação histológica das principais compostas brasileiras de emprego medicinal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2):47-51, 1991.

RESUMO: Foram descritas as folhas das seguintes espécies da família Compositae: *Baccharis trimera* DC (carqueja), *Stevia rebaudiana* Bert. (stevia), *Tagetes cf patula* L. (cravo de defunto) e *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe). Observou-se que estas espécies seguem o padrão geral da família a que pertencem. Detalhes de tricomas glandulares, colênquima, fibras, células pétreas, papilas e glândulas secretoras foram fundamentais para a diagnose.

DESCRIPTORIOS: *Baccharis trimera* DC, carqueja, *Stevia rebaudiana* Bert., stevia, *Tagetes cf patula* L., cravo de defunto, *Vernonia polyanthes* Less, assa-peixe.

INTRODUÇÃO

Muitas compostas têm sido empregadas medicinalmente de tempos em tempos. Entre aquelas que se tornaram de uso contínuo e tradicional destacamos as seguintes espécies: *Matricaria chamomila* Linn. (camomila vulgaris), *Anthemis nobilis* L. (camomila romana), *Arnica montana* L. (arnica), *Calêndula officinalis* L. (calêndula), *Artemisia cina* Berg (artemisia), *Baccharis trimera* DC (carqueja), *Stevia rebaudiana* Bert. (stevia), *Tagetes cf patula* (cravo de defunto), *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe).

Neste trabalho são descritas as quatro últimas espécies, por serem sul-americanas e pouco estudadas. *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe) é uma das várias espécies do gênero *Vernonia* conhecidas como assa-peixe, e consideradas medicinais⁵. O gênero *Vernonia* tem sido estudado em sua composição química com vistas ao seu emprego como anti-oxidante¹¹ e como droga anti-helmíntica^{4,10}. *Tagetes cf patula* (cravo de defunto) é planta anual, herbácea, ornamental (flores amarelas e aveludadas), empregada pelas suas ações anti-tussígena, purgante, estimulante, sudorífica e

aromática. Floresce de outubro a fevereiro⁵. Várias espécies do gênero *Tagetes* são importantes pelo seu teor de terpenóides, flavonóides, alcalóides, poliacetilenos e ácidos graxos^{4,7 e 10}. *Stevia rebaudiana* Bert. (stevia) é uma erva paraguaia aclimada no Brasil^{1,8}. Contém um glicosídeo (esteviosídeo) trezentas vezes mais doce do que a sacarose¹, e uma substância anticoncepcional, empregada com esse fim pelas populações indígenas daquela região¹. *Baccharis trimera* DC, chamada de carqueja amargosa, é um sub-arbusto ereto, ramoso e glabro, de até 80 cm de altura. É melífera, tônica, estomáquica, anti-reumática, anti-helmíntica, útil nas moléstias do fígado e na diabetes. Ocorre em todo o Brasil⁶.

MATERIAL E MÉTODO

As espécies *Tagetes cf patula* L. (cravo de defunto) e *Baccharis trimera* DC (carqueja) foram coletadas no bairro de Santo Amaro. A primeira foi identificada pela pesquisadora Inês Cordeiro do Instituto de Botânica, São Paulo, SP. A segunda foi identificada por confrontação com padrões existentes em nosso laboratório, e dados encontrados

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar, Instituto Adolfo Lutz, Capital, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz

na literatura. *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe) foi coletada na Cidade Universitária, nas imediações do estacionamento do Instituto de Biociências, tendo sido identificada pela pesquisadora Lúcia Rossi do Instituto de Botânica, São Paulo, SP. Na descrição de *Stevia rebaudiana* Bert. foram empregados padrões existentes em nosso laboratório.

Foram empregados cortes a mão livre, soluções descorantes, corantes histológicos, câmara clara, escala micrométrica e microscópio óptico.

RESULTADOS

Baccharis trimera DC (carqueja)

Vegetal bem estudado por SANTOS⁹, *Baccharis trimera* DC é espécie rica em características xeromorfas: fibras, epiderme (cladódios) constituída de células de paredes retas e espessas, estômatos com poro reforçado, tricomas tectores.

Baccharis trimera DC apresenta um tipo de tricoma tector e um tipo de tricoma glandular (Fig. 1). O último é mais freqüente do que o primeiro.

Seccionando-se transversalmente as alas dos cladódios, observamos que o mesmo apresenta estrutura foliar, com mesofilo homogêneo lacunoso e estômatos ao nível das demais células epidérmicas.

Seccionando-se transversalmente o eixo dos cladódios, observam-se os seguintes elementos histológicos: colênquima bem desenvolvido situado logo abaixo da epiderme; feixes vasculares do tipo colateral com uma "calota" de fibras esclerenquimáticas perivasculares, eternamente ao floema; endoderme que percorre o eixo do cladódio externa ou internamente às "calotas esclerenquimáticas"; xilema rico em fibras. A endoderme é notável pelas dimensões e formatos irregulares que tomam suas células. As calotas de fibras esclerenquimáticas peri-vasculares tanto podem ter origem floemática (floema primário amassado) ou periciclíca. Somente estudos de ontogênese poderiam esclarecer essa questão.

Stevia rebaudiana Bert.

As folhas de *Stevia rebaudiana* Bert. são obovadas, com margem denteada em torno do ápice, e inteira nas regiões mediana e basal. Tem comprimento médio de quatro centímetros, nervuras bem salientes na face dorsal (ou inferior) e ligeiramente salientes na face ventral (ou superior).

Ambas as epidermes são estomatíferas (estômatos anomocíticos). Há um tricoma tector pluricelular de base alargada e ápice afunilado. O tricoma glandular, visto de face, apresenta uma grande cabeça de conteúdo pardacento (quando se observa material descorado). Observados em corte

transversal, apresentam-se pedunculados, de três a cinco células achatadas, inseridas em depressões das células epidérmicas.

As células das nervuras são alongadas tangencialmente, apresentando cutícula estriada e paredes pontoadas. Células pétreas de paredes grossas e onduladas, formatos alongados, são observadas junto aos vasos (Fig. 4). Essas células pétreas às vezes assumem formatos bastante alongados, e terminação em bisel, constituindo fibras. Coram-se fracamente pela solução clorídrica de floroglucina. São elementos histológicos que conferem sustentação à folha e proteção ao feixe vascular.

O mesofilo é dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico, e duas ou três camadas de parênquima lacunoso.

Tagetes cf patula L. (cravo de defunto)

Tagetes cf patula L. apresenta folhas miúdas, alternas ou opostas, margem fortemente denteada, cerca de um centímetro e meio de comprimento.

As epidermes são indistintas, estomatíferas, com estômatos anomocíticos. Há um tricoma tector pluricelular e um tricoma tector unicelular (Fig. 5). O tricoma pluricelular é abundante, apresentando células de formatos diferenciados, especialmente no ápice. O tricoma unicelular é raro.

O mesofilo é dorsiventral. Há drusas e glândulas secretoras.

No ápice e nos bordos foliares encontram-se papilas de aspecto original (Fig. 5).

Ao nível de nervura central o feixe vascular é bicolateral, cercado de abundante colênquima (Fig. 5).

Vernonia polyanthes Less.

As folhas são lanceoladas, cerca de quinze centímetros de comprimento, nervuras duplamente proeminentes, mais proeminentes na face inferior (dorsal), que também se apresenta mais fortemente pilosa em relação à face superior (ventral). Como em *Tagetes cf patula* L., há tricomas pluricelulares homocelulares e heterocelulares (Fig. 6).

A epiderme inferior é constituída de células de paredes delgadas, onduladas, apresentando estômatos anomocíticos. A epiderme superior é constituída de células relativamente maiores, poligonais, de paredes quase retas, sem estômatos.

Vernonia polyanthes Less apresenta tricoma glandular com cabeça arredondada, grande, unicelular, inserido diretamente em depressões da epiderme, sem pedúnculo. Há grande quantidade de drusas em toda a região parenquimática. O mesofilo é dorsiventral, com uma ou duas camadas de parênquima paliçádico.

A região da nervura central apresenta cinco ou seis feixes vasculares, individualizados, recobertos por duas "calotas" de fibras (Fig. 6). Há colênquima discreto em ambas as faces.

Tubos de látex, retos e de grande calibre são encontrados no mesofilo (Fig. 6).

DISCUSSÃO

METCALFE & CHALK^{2,3} prevêm certas características histológicas gerais para determinados gêneros, que tivemos oportunidade de confirmar nas espécies que estudamos: — Presença de pêlos tectores e glandulares no gênero *Baccharis*, bem como ausência de cristais neste gênero; — Ocorrência de cristais agrupados e canais laticíferos em *Vernonia*; — Presença de cavidades secretoras em *Tagetes*.

Não encontramos referência bibliográfica que destacasse a ocorrência de células pétreas fibriformes, muito características, que observamos em *Stevia rebaudiana* Bert.

Não encontramos também, nenhum relato acerca do abundante colênquima, e das papilas atípicas que encontramos em *Tagetes cf patula* L.

Fibras, células pétreas, colênquima, paredes espessas, etc, são adaptações antômicas a condições xéricas. A presença desses elementos histológicos nas compostas estudadas é uma evidência de que

são plantas bem adaptadas às condições do ambiente em que vegetam.

CONCLUSÕES

As compostas estudadas revelaram os seguintes elementos histológicos característicos de cada espécie:

— *Baccharis trimera* DC: tricoma glandular de cabeça unicelular e pedúnculo pluricelular, tricoma tector unicelular com base pluricelular, epiderme de paredes retas e espessas, fibras retas.

— *Stevia rebaudiana* Bert.: Tricoma tector pluricelular de dimensões medianas, tricoma glandular com grande cabeça unicelular e pedúnculo inserido em depressões, células pétreas e fibras características.

— *Vernonia polyanthes* Less: grandes tricomas tectores pluricelulares (cerca de 1 mm de comprimento), drusas e tubos de látex.

— *Tagetes cf patula* L.: Colênquima abundante, papilas nas bordas foliares e glândulas secretoras.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Inês Cordeiro e à Dra. Lúcia Rossi, do Instituto de Botânica (SP-Capital), pela identificação das espécies enumeradas em Material e Método.

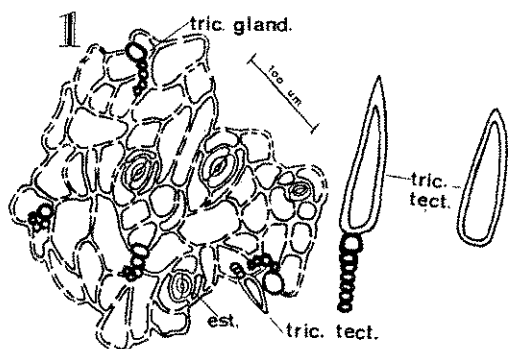


FIGURA 1

Baccharis trimera DC — Epiderme do cladódio: tric. gland. = tricoma glandular; est. = estômato; tric. tect. = tricoma tector.

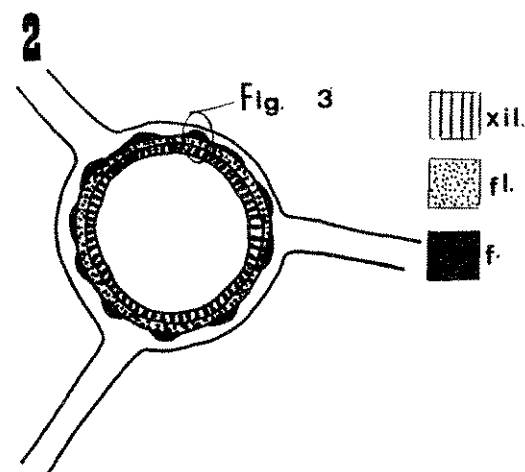


FIGURA 2

Baccharis trimera DC — Eixo do cladódio (c. transv.) — Desenho esquemático; xil. = xilema; fl. = floema; f. = fibras.

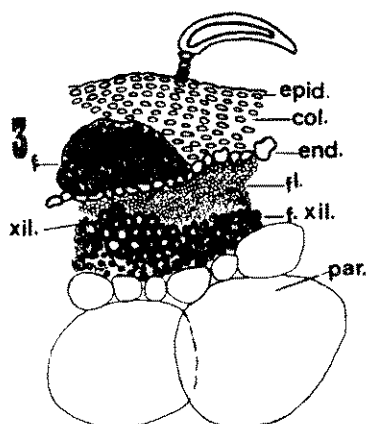


FIGURA 3

Baccharis trimera DC — Fragmento do eixo do cladódio (corte transv.); epid. = epiderme; col. = colênquima; end. = endoderme; f. = fibras; fl. = floema; f. xil. = fibras xilemáticas; xil. = xilema; par. = parênquima.

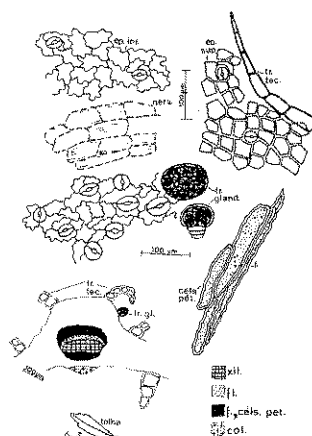


FIGURA 4

Stevia rebaudiana Bert. — Folha, elementos histológicos foliares e desenho esquemático da nervura central: ep. inf. = epiderme inferior; nerv. = nervura; ep. sup. = epiderme superior; tric. tect. = tricoma tector; tric. gland. = tricoma glandular; cél. pét. = células pétreas; f. = fibras.

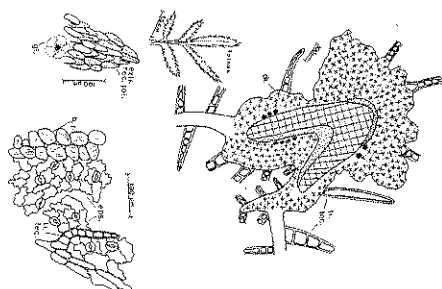


FIGURA 5

— *Tagetes cf patula* — Folhas, elementos histológicos foliares e desenho esquemático da nervura central: extr. rec. fol. = extremidade de recorte foliar; gl. = glândula secretora; eps. = epidermes; b. f. = borda foliar; tric. tec. = tricoma tector.

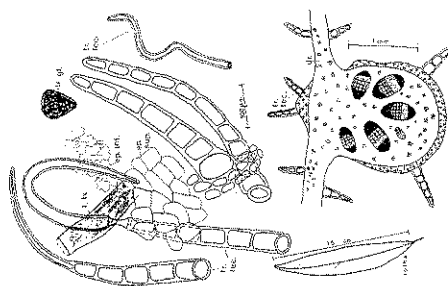


FIGURA 6

Vernonia polyanthes Less — Folha, elementos histológicos foliares e desenho esquemático da nervura central: tric. tec. = tricoma tector; ep. inf. = epiderme inferior; t. lx. = tubo de látex; tr. gl. = tricoma glandular; dr. = drusas.

RIALA6/708

JORGE, L. I. F.; PEREIRA, U. & SILVA, A. M. — Histological identification of main Brazilian Compositae of medicamentous use. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2): 47-51, 1991.

ABSTRACT: It was described the leaf of the following species: *Baccharis trimera* DC (carqueja), *Stevia rebaudiana* Bert. (stevia), *Tagetes cf patula* L. (cravo de defunto) e *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe). It was observed that these species follows the general pattern of the family. Details of glandular hairs, collenchyma, fibres, stone cells, papillas and secretory glands were fundamental to the diagnosis.

DESCRIPTORS: *Baccharis trimera* DC, carqueja, *Stevia rebaudiana* Bert., *Tagetes cf patula* L., cravo de defunto, *Vernonia polyanthes* Less, assa-peixe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FELIPE, G. M. — *Stevia rebaudiana* Bert.: a review. *Ciênc. Cult.*, 29(11):1240-8, 1977.
2. METCALFE, C. R. & CHALK, L. — *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 1950. v. 2. p. 782-805.
3. METCALFE, C. R. & CHALK, L. — *Anatomy of the Dicotyledons*. 2. ed. Oxford, Clarendon Press, 1983. v. 1. p. 41-53.
4. PECKOLT, G. — O valor dos anti-helmínticos brasileiros. *Rev. Flora med.*, 9 (7):333-79, 1942.
5. PENNA, M. — *Dicionário brasileiro de plantas medicinais: descrição das plantas medicinais indígenas e das exóticas aclimadas no Brasil*. 3. ed. Rio de Janeiro, Kosmos, 1946. p. 376.
6. PIO CORREA, M. — *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1978. v. 2. p. 74-5.
7. RODRIGUEZ, E.; MABRY, T. J. — Tageteaceae-chemical review. In: HEYWOOD, V. H. et alii — *The biology and chemistry of the Compositae*. London, Academic Press, 1977. v. 2. p. 785-97.
8. SAMANIEGO, C. C. — *Stevia rebaudiana*. *Rev. Farm.*, 88(5): 199-202, 1946.
9. SANTOS FILHO, D. — Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Baccharis trimera*. Ribeirão Preto, 1979. [Tese doutorado — Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão, USP].
10. SCOTT, W. E. & KREWSON, C. F. — *Euphorbia lagascae* Spreng. enzyme activity in the seed. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 43 (7):466-8, 1966.
11. SIMS, R. J. et alii — Sterol additives as polymerization inhibitors for frying oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49 (5):298-301, 1972.

Recebido para publicação em 01 de Outubro de 1990

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROSCÓPICA DE EXTRATO, PURÊ E POLPA DE TOMATE.*

Regina Sorrentino MINAZZI-RODRIGUES**
Marcia Regina Pennacino do AMARAL MELLO**
Claydes de Quadros ZAMBONI**
Nazareth SPITERI**

RIALA6/709

MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; AMARAL MELLO, M.R.P. do; ZAMBONI, C.Q. & SPITERI, N. — Avaliação físico-química e microscópica de extrato, purê e polpa de tomate. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 53-56, 1991.

RESUMO: Foram analisadas 122 amostras de extrato, purê e polpa de tomate, comercializadas na região metropolitana de São Paulo, no período de fevereiro de 1988 a fevereiro de 1990, para averiguar o cumprimento da legislação com relação às características físico-químicas e microscópicas. Observou-se que 67,7% dos extratos e 100% dos purês de tomate, encontravam-se de acordo com a legislação vigente, quanto às características físico-químicas. Os resultados da análise microscópica, quanto à contagem de filamentos micelianos, mostraram que 48,4% dos extratos e 46,7% dos purês de tomate estavam em desacordo com a legislação. Se as polpas de tomate forem enquadradas nos mesmos limites estabelecidos para o purê, 33,3% e 60% das amostras estariam em desacordo com a legislação, quanto às características microscópicas, com relação à contagem de filamentos micelianos pelo método de Howard e físico-químicas, respectivamente. A identificação de elementos histológicos de vegetais dos produtos, revelou que tanto os purês como as polpas continham epicarpo (pele) e sementes de tomate, além da presença de material estranho como areia, nematóides, leveduras e esporos.

DESCRITORES: tomate, extrato, purê e polpa; análise físico-química; análise microscópica; legislação.

INTRODUÇÃO

Dentre as hortaliças, o tomate é a de cultura mais importante, não só em termos de produção, como também em valor econômico, pois, é a mais industrializada⁷.

O tomate pode, através de um processamento adequado, dar origem a inúmeros produtos, alguns deles, de elevado consumo no Brasil como, o suco, purê, polpa concentrada, extrato, catchup, tomate despelado, diversos molhos culinários e inclusive tomate em pó⁷.

Pela legislação brasileira de 1978, são englobados quanto às características físico-químicas, nas normas de extrato de tomate, todos os produtos concentrados que tenham no mínimo 9% (p/p) de

substância seca, menos cloreto de sódio. Todavia, essa mesma legislação reserva o termo purê para o concentrado que tem entre 9 e 17,9%. Aos que têm 18% ou mais é atribuído o nome extrato^{2,8}. No entanto, nenhum parâmetro é estabelecido para a polpa de tomate. Quanto às características microscópicas, a legislação brasileira estabelece para extrato e purê de tomate um limite máximo de 40% de campos positivos (de fungos) na contagem pelo método de Howard e ausência de sujidades, parasitos e larvas^{2,8}.

A utilização de matéria prima não selecionada resulta num produto final de qualidade inferior. Sabe-se que há uma estreita relação entre frutos estragados e conteúdo de fungos no produto final. Cerca de 1% de tomates alterados, já é suficiente para atingir na contagem de Howard obtida pelo

* Realizado nas Seções de Óleos, Gorduras e Condimentos e Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no VI Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Curitiba, 1990.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

exame microscópico, um percentual de campos positivos (de fungos) não inferior a 60%⁷.

O presente trabalho tem como objetivos averiguar se os purês e os extratos de tomate apresentaram-se de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor, assim como, estabelecer parâmetros de qualidade e identidade para polpa de tomate, não previstos na legislação vigente, que possam servir de subsídio para a atualização e revisão das NTA (Decreto Estadual 12.486/78)⁸ e NTE (Decreto Federal 12/78)².

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 122 amostras, de diferentes marcas, assim distribuídas: 62 extratos, 30 purês e 30 polpas de tomate comercializadas na região metropolitana de São Paulo, adquiridas em vários pontos da cidade no período de fevereiro de 1988 a fevereiro de 1990.

Efetuuou-se análise físico-química, que compreendeu as determinações de substância seca, resíduo mineral fixo, cloretos em cloreto de sódio e pes-

quisa de corantes artificiais segundo as técnicas descritas no livro de "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"^{3,4,5,6}. A análise microscópica, por sua vez, compreendeu a identificação de elementos histológicos, a contagem de filamentos micelianos pelo método de Howard e a pesquisa de material estranho^{1,9,10}.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise das 122 amostras, para a determinação de substância seca menos cloretos, para os extratos e purês de tomate, com relação aos valores mínimos exigidos pela legislação, encontram-se na Tabela 1. Nesta tabela encontram-se também os resultados obtidos para polpa de tomate, não prevista na legislação vigente.

O desenvolvimento do trabalho sobre polpa de tomate em conjunto com o extrato e purê deve-se ao fato da semelhança entre os produtos e por conseqüência os mesmos paradigmas a serem analisados.

TABELA 1

Distribuição das amostras de extrato, purê e polpa de tomate segundo o percentual de substância seca menos cloreto de sódio.

Substância seca menos cloreto de sódio (%)	EXTRATO		PURÊ		POLPA	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
≥ 18	42	(67,7)	—	—	—	—
< 18	20	(32,3)	—	—	—	—
≥ 9	—	—	30	(100,0)	12	(40,0)
< 9	—	—	0	(0,0)	18	(60,0)
Total	62	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)

TABELA 2

Porcentagem de campos positivos com filamentos micelianos em extratos, purês e polpas de tomate.

CAMPOS POSITIVOS COM FILAMENTOS MICELIANOS (%)	EXTRATO		PURÊ		POLPA	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
0 — 10	3	(4,8)	1	(3,3)	2	(6,7)
12 — 20	6	(9,7)	2	(6,7)	9	(30,0)
22 — 30	11	(17,7)	6	(20,0)	4	(13,3)
32 — 40	12	(19,4)	7	(23,3)	5	(16,7)
42 — 50	5	(8,1)	4	(13,3)	1	(3,3)
52 — 60	11	(17,7)	6	(20,0)	2	(6,7)
62 — 70	5	(8,1)	2	(6,7)	4	(13,3)
72 — 80	7	(11,3)	2	(6,7)	0	(0,0)
82 — 90	1	(1,6)	0	(0,0)	3	(10,0)
> 92	1	(1,6)	0	(0,0)	0	(0,0)
Total	62	(100,0)	30	(100,0)	30	(100,0)

A Tabela 2 apresenta para cada tipo de produto analisado, os resultados para a contagem de filamentos micelianos.

A Tabela 3 apresenta material estranho e impurezas nas 30 amostras de purê e de polpa analisadas. Quanto ao extrato de tomate, somente em uma

amostra foi identificado epicarpo, não tendo sido encontradas sementes nas 62 amostras analisadas, assim como o material estranho detectado nos purês e polpas.

Em nenhuma das amostras analisadas verificou-se a presença de corantes artificiais.

TABELA 3

Material estranho e impurezas em 30 amostras de purê e 30 amostras de polpa de tomate.

MATERIAL ESTRANHO E IMPUREZAS	N°	PURÊ		POLPA	
		PRESENÇA %	AUSÊNCIA N°	PRESENÇA n°	AUSÊNCIA N°
Epicarpo	19	(63,3)	11	19	11
Semente	6	(20,0)	24	23	7
Leveduras	6	(20,0)	24	6	24
Esporos	3	(10,0)	27	5	25
Nematóides	5	(16,7)	25	3	27
Areia	8	(26,7)	22	15	15

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Analisando a Tabela 1, quanto aos resultados físico-químicos, observa-se que a maior parte das amostras de extrato de tomate (67,7%) e a totalidade das amostras de purê, encontram-se de acordo com os limites estabelecidos pela legislação vigente, quanto à porcentagem de substância seca menos cloreto de sódio.

Os resultados obtidos na análise microscópica (Tabela 2) mostram que 48,4% das 62 amostras de extrato e 46,7% das 30 amostras de purê estão em desacordo com a legislação em vigor, por apresentarem porcentagem de campos positivos com filamentos micelianos superior ao limite tolerado.

Com relação aos resultados obtidos para polpa de tomate, observa-se que os valores encontrados aproximam-se aos do purê de tomate. Sendo assim, pretende-se sugerir que a denominação polpa de tomate seja incluída como sinônimo do purê, e portanto se enquadre nos mesmos limites estabelecidos para este, quando por ocasião da atualização e revisão das legislações Estadual e Federal.

Se as polpas de tomate forem enquadradas nos mesmos limites estabelecidos para o purê, 60% das

Se as polpas de tomate forem enquadradas nos mesmos limites estabelecidos para o purê, 60% das amostras estariam em desacordo com a legislação quanto às características físico-químicas e 33,3% quanto às características microscópicas, em relação à contagem de filamentos micelianos.

Além disso pode-se concluir que a tecnologia de processamento dos purês e das polpas é inadequada, pela presença de epicarpo e semente; 63,3% das amostras tanto de polpa como de purê continham epicarpo do tomate; 20% das amostras de purê e 76,7% das amostras de polpa, continham semente (Tabela 3). Este fato caracteriza a utilização do tomate inteiro na confecção dos produtos, o que contraria a legislação em vigor.

Os extratos de tomate, por outro lado, estão cumprindo melhor a legislação em vigor, que exige ausência de pele e semente no produto, visto que, somente em uma, das 62 amostras analisadas, foi observada presença de epicarpo. Também as condições higiênicas dos purês e polpas são precárias, indicadas pela presença de areia, nematóides, leveduras e esporos, destacando-se a presença de areia em 50% das amostras de polpa analisadas e em 26,7% das amostras de purê.

RIALA6/709

MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; AMARAL MELLO, M.R.P. do; ZAMBONI, C.Q. & SPITERI, N. — Tomato paste, tomato puree and tomato pulp: chemical and microscopical evaluation. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 53-56, 1991.

ABSTRACT: Chemical and microscopical analysis of 122 samples of tomato paste, puree and pulp acquired at the market of São Paulo, Brazil were made with the aim to verify if they are in accordance with the Brazilian legislation. It was found that 67,7% of the tomato paste samples and 100% of the tomato puree samples agreed with the chemical pattern. The microscopical analysis disclosed that 48,4% of the tomato paste samples and 46,7% of the tomato puree samples disagreed with the amount of mycelia counts by the Howard method permitted by the Brazilian legislation. If the same patterns for tomato puree were applied for tomato pulp, 60% of the samples disagreed with the chemical pattern and 33,3% of the samples disagreed with the limit of mycelia counts by Howard method permitted by the legislation. The histological identification of the products vegetable components revealed that the puree and the pulp had tomato epicarp and seeds, besides extraneous material such as sand, nematodes, yeast and spores.

DESCRIPTORS: tomato, paste, puree and pulp; chemical analysis; microscopical analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1975. p. 883 (Tecn. 44.092).
2. 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. 11506. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)...
3. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESPE, 1985. V.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. p. 25.
4. Id., *ibid.*, p. 27-28.
5. Id., *ibid.*, p. 36-37.
6. Id., *ibid.*, p. 107.
7. MINANI, K. & FONSECA, H. — *Tomate: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, s.d. 92 p. (Série Extensão Agroindustrial, 8).
8. São Paulo. Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p.16 (NTA 32). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
9. ZAMBONI, C.Q., coord. — *Manual de análise microscópica de alimentos*. São Paulo, 1986. p. 30 (apostila mimeografada).
10. Id., *ibid.*, p. 60.

Recebido para publicação em 23 de outubro de 1990.

DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VÍRUS DO GRUPO HERPES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA: — OBSERVAÇÕES ATÍPICAS NAS AMOSTRAS DE PACIENTES AIDÉTICOS.

Marli UEDA*
Hatune TANAKA*
Jonas José KISIELIUS*
Paulo Pinto JOAZEIRO*

RIALA6/710

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J. & JOAZEIRO P. P. — Diagnóstico rápido de vírus do grupo Herpes por microscopia eletrônica — observações atípicas nas amostras de pacientes aidéticos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):57-62, 1991.

RESUMO: A Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz recebeu no período de 1986-90, 129 amostras de materiais biológicos (líquido vesicular, raspado de lesão genital, raspado de lesão anal, saliva e urina) de pacientes aidéticos, com suspeita de infecção herpética, para diagnóstico rápido de vírus do grupo Herpes, por microscopia eletrônica. Dessas amostras, 25% (32/129) foram positivas para vírus Herpes, com algumas apresentando aspectos atípicos, tais como: a) grande quantidade de partículas virais; b) detecção de mais de um nucleocapsídeo num mesmo envoltório; e c) detecção de grandes agregados de nucleocapsídeos sem envoltórios.

Estas observações poderiam ser atribuídas às características de imunodepressão desses pacientes e a sua divulgação foi por nós considerada importante, pois seriam dados adicionais para o estudo de infecções virais, nesses pacientes imunodeprimidos.

DESCRITORES: — Herpesvírus, Microscopia Eletrônica, Infecção Oportunista

INTRODUÇÃO

O uso da microscopia eletrônica para a detecção de partículas virais é um dos métodos utilizados para o diagnóstico rápido de vírus^{1,10,11}.

O diagnóstico rápido de vírus proporciona a identificação etiológica em poucas horas propiciando ao clínico, facilidade na escolha das terapêuticas e melhor atendimento ao paciente¹¹.

A Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, realiza diagnóstico rápido de vírus, desde 1967^{14,16,21} e vem ampliando o seu campo de atuação. Vírus Herpes em infecções herpéticas; Rotavírus, Adenovírus e "SRVP" ("Small Round Virus Particles") em gastroenterites; "Papovavirus-

like", Moluscum contagiosum e eventual Poxvírus em lesões cutâneas; "Parvovirus-like" em urina de pacientes suspeitos de eritema infeccioso, são alguns dos diagnósticos realizados por esta Seção.

O diagnóstico do vírus Herpes pela Microscopia Eletrônica Direta (MED) é fácil^{1,10,11,14,19}, cujas características morfológicas são: — cerne de aproximadamente 75 nm que pode ser elétron-lucente (quando o ácido nucléico-DNA está presente) ou elétron-denso (vazio, sem o ácido nucléico); um capsídeo icosaédrico contendo 162 capsômeros que circunda o cerne, medindo cerca de 100 nm e um envoltório pleomórfico de 180 a 200 nm^{2,7,9,20,25,26}.

* Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

Tal morfologia permite um diagnóstico presuntivo, pois não diferencia os tipo-específicos do vírus do grupo Herpes, que podem ser Herpes simples do tipo I, II, Varicela-zoster e Citomegalovírus. Estudo realizado por Imunomicroscopia Eletrônica utilizando anticorpo monoclonal e marcação com ouro-coloidal, permitiu a identificação entre vírus Herpes tipo I, II e Varicela-zoster²⁴. Entretanto, a diferenciação morfológica é de fundamental importância no diagnóstico diferencial entre Varicela e Vaccinia¹¹ e nas detecções de infecções herpéticas em centros cirúrgicos e berçários.

Com a disseminação da AIDS tem sido observada uma elevação na frequência de infecções oportunistas nestes doentes, incluindo-se aquelas por vírus do grupo Herpes^{8,18,23}. Na análise ultraestrutural desses vírus, em amostras provenientes de pacientes aidsícos, foram detectadas com grande frequência aspectos atípicos.

A caracterização e divulgação destas observações incomuns foram para nós consideradas importantes e oportuna.

MATERIAIS & MÉTODOS

Foram examinadas no período de 1986-90, 129 amostras (líquido vesicular — 50, raspado de lesão anal — 48, raspado de lesão genital — 7, urina — 17 e saliva — 7) de pacientes com AIDS provenientes de toda rede hospitalar pública do Estado de São Paulo, principalmente do Hospital Emílio Ribas.

Essas amostras foram submetidas à técnica de contração negativa (Microscopia Eletrônica Direta-MED)⁴, empregando-se como contrastante o Silicotungstato de sódio 1% em pH 7.1 e examinadas num microscópio eletrônico Philips Em-400T, operando a 80 kV.

RESULTADO

Os resultados por tipo de amostra são apresentados na tabela 1.

TABELA 1.

Tabela de percentual de positividade por tipo de amostra.

TIPO DE AMOSTRAS	Nº DE AMOSTRAS	Nº DE POSITIVOS	% DE POSITIVIDADE
Líquido vesicular	50	28	56,0
Raspado de lesão anal	48	3	6,3
Raspado de lesão genital	7	1	14,3
Saliva	7	0	0
Urina	17	0	0
Total	129	32	24,8

Os aspectos da morfologia clássica do vírus do grupo Herpes descritos na literatura^{2,7,9,20,25,26} são apresentados na figura 1.

Os aspectos atípicos foram observados somente nas amostras de líquido vesicular:

— A maioria das amostras positivas (cerca de 90%) apresentaram grande número de partículas virais, predominando-se as partículas completas com ácido nucléico (figura 1) em relação às incompletas (figura 2).

— Foram detectadas mais de um nucleocapsídeo no mesmo envoltório (figura 3) em 6 das amostras positivas (6/28-21,4%).

— Grandes agregados de nucleocapsídeos (com ou sem ácido nucléico) foram observados em 2 das amostras positivas (2/28-7,1%) (figura 4).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

São descritas na literatura freqüentes ocorrências de infecções oportunistas generalizadas, causadas por vírus do grupo de Herpes em pacientes

imunodeprimidos (transplantados renais, leucêmicos, cancerosos) e também em portadores de outras síndromes causadoras de imunodeficiências como a AIDS^{5,8,13,16}. Porém, nesses estudos não são citados os aspectos atípicos do vírus Herpes, em infecções de pacientes imunodeprimidos.

Analisando os nossos resultados por tipo de amostra, podemos notar o baixo percentual de positividade nas amostras de raspados de lesão anal e genital. Em 1975, Daniels et al.⁶, demonstraram em culturas de células a presença de altos títulos de vírus Herpes tipo I, isolados de amostras colhidas por "swab", de lesões da mucosa labial. Como as amostras de lesão, por nós examinadas, eram na maioria, escarificações de lesão anal, esse baixo índice de positividade, provavelmente poderia ter ocorrido devido a dificuldades na colheita desses materiais e presença de muco, mascarando a detecção das partículas de vírus.

Quanto a exames de urina não foi observado nenhum resultado positivo, apesar de estudos reali-

zados em urina de crianças com infecções congênitas terem detectados presença de Citomegalovírus por microscopia eletrônica direta^{12,15 e 17}.

A não detecção de nenhum resultado positivo na saliva talvez se deve a pequena amostragem examinada. Lee et al, em 1978¹⁵ detectaram a presença de vírus tanto em urina como em saliva de crianças infectadas por Citomégalo vírus.

Os aspectos atípicos do vírus Herpes foram observados somente nas amostras de líquido vesicular, onde o índice de positividade foi maior. A grande quantidade de vírus e facilidade na colheita da amostra neste estágio de infecção^{9, 19}, provavelmente contribuíram para a detecção desses achados.

Os nossos resultados apresentam características peculiares como a detecção de grandes quantidades de partículas virais, predominando as partículas completas com a presença do DNA viral (figura 1) e a presença de dois ou mais nucleocapsídeos num mesmo envoltório (figura 3). Normalmente nos diagnósticos de rotina, a maioria das partículas virais são incompletas, apresentando capsídeos vazios, com contrastante no seu interior e muito raramente

são detectados dois ou mais nucleocapsídeos num mesmo envoltório. Os grandes agregados de nucleocapsídeos sem envoltórios (figura 4), foram observados apenas em amostras de pacientes aids.

Estudos anteriores realizados por Bauer et al., em 1988³, mostraram em cortes ultra-finos de autópsia de pulmão de paciente com AIDS, células alveolares infectadas por citomegalovírus. O citoplasma dessas células revelaram partículas de vírus completas e incompletas, isoladas, no interior de materiais densos ou ainda agrupadas no interior de vacúolos, que poderiam dar origem às formações atípicas dos vírus Herpes por nós observadas com o emprego da contrastação negativa.

A grande frequência dessas detecções atípicas do vírus do grupo Herpes poderiam ser atribuídas a imunodepressão desses pacientes^{13,18,22} e a divulgação destes aspectos incomuns seriam dados adicionais para o estudo de infecções virais em pacientes imunodeprimidos.

Estudos futuros serão realizados visando a compreensão dessas alterações aqui caracterizadas.

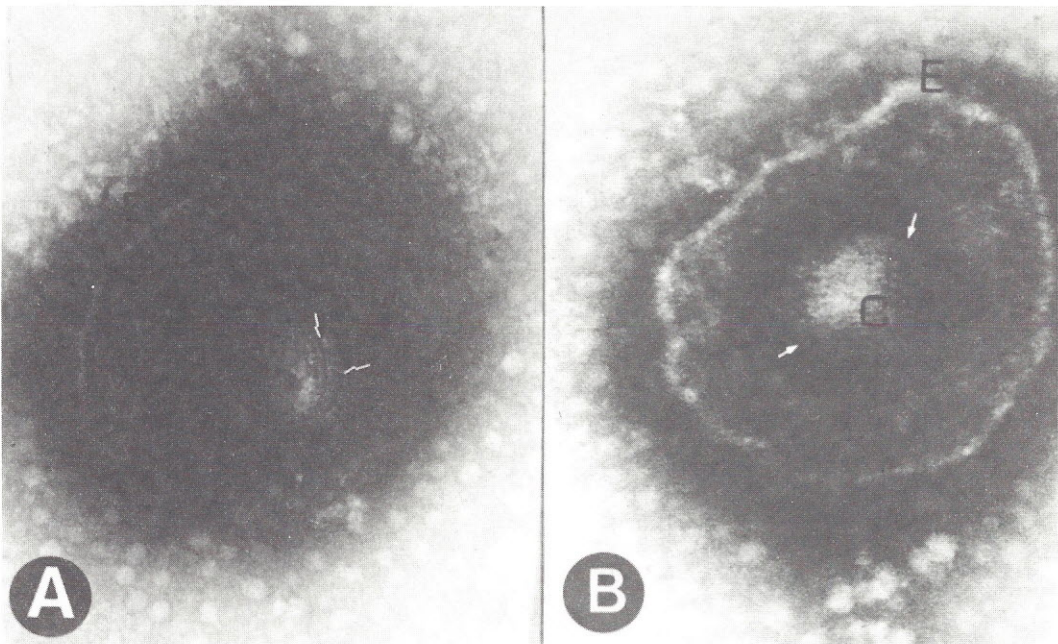


FIGURA 1

Morfologia clássica de vírus do grupo Herpes. Em A, as setas indicam a presença de enovelado do ácido nucléico-DNA no interior do capsídeo. Em B, as estruturas do capsídeo estão mais claramente evidenciadas. As setas apontam os capsômeros que compõem o capsídeo.

E-envoltório C-nucleocapsídeo Aumentos: — A-210.000x; B-225.000x

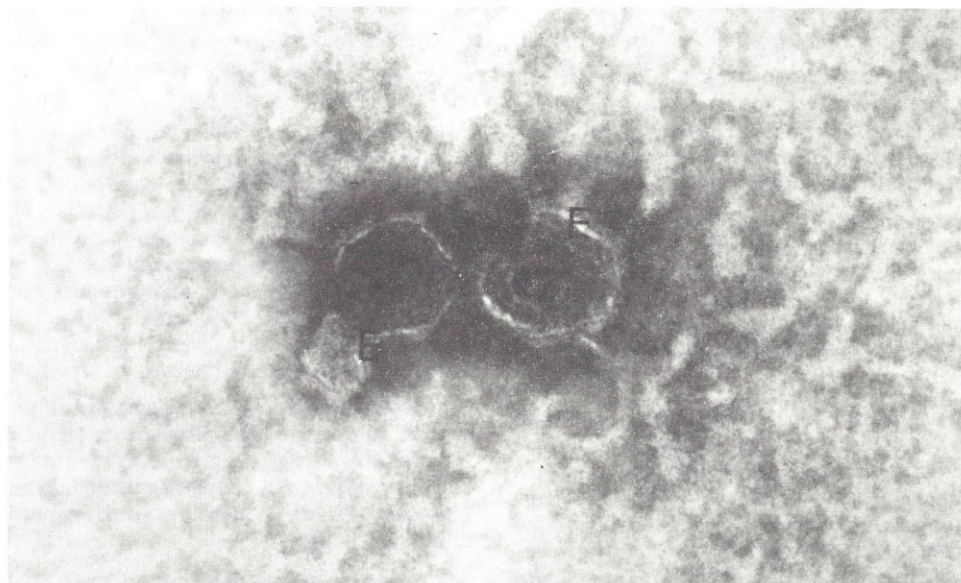


FIGURA 2

Partículas de vírus do grupo Herpes incompletas (sem ácido nucléico).

E-envoltório C-cápside vazio sem ácido nucléico Aumento: — 78.000x

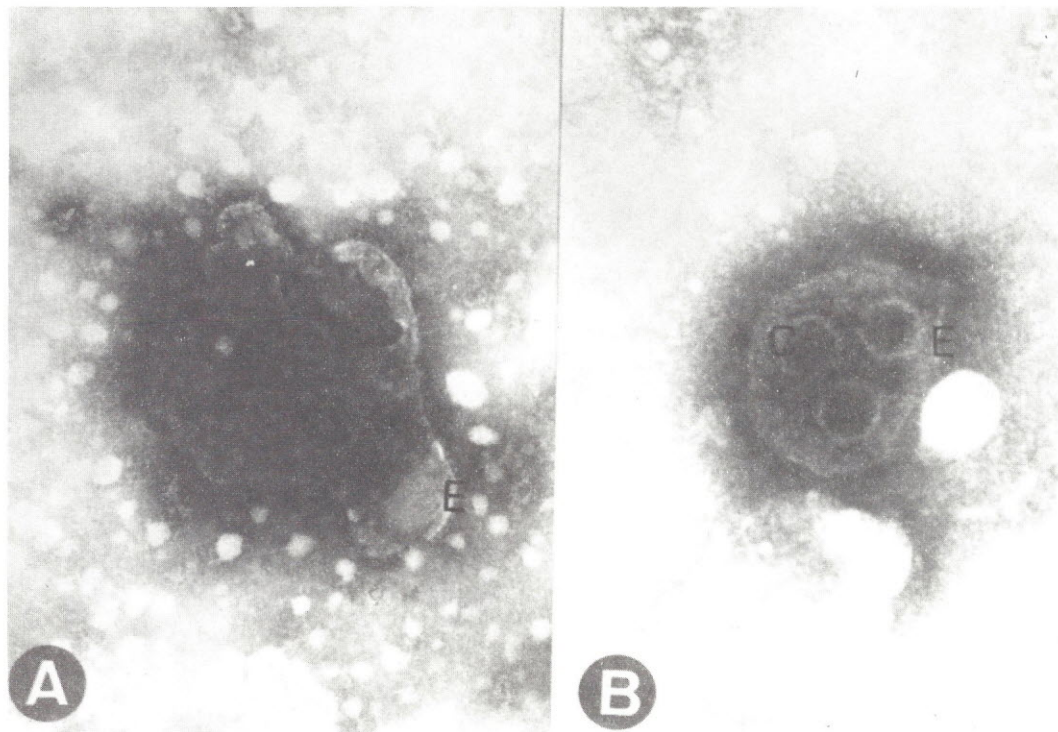


FIGURA 3

Partículas de vírus do grupo Herpes. Em A, com dois nucleocapsídeos e em B com três, num mesmo envoltório.

E-envoltório C-cápside Aumentos: — A-115.000x; B-82.000x

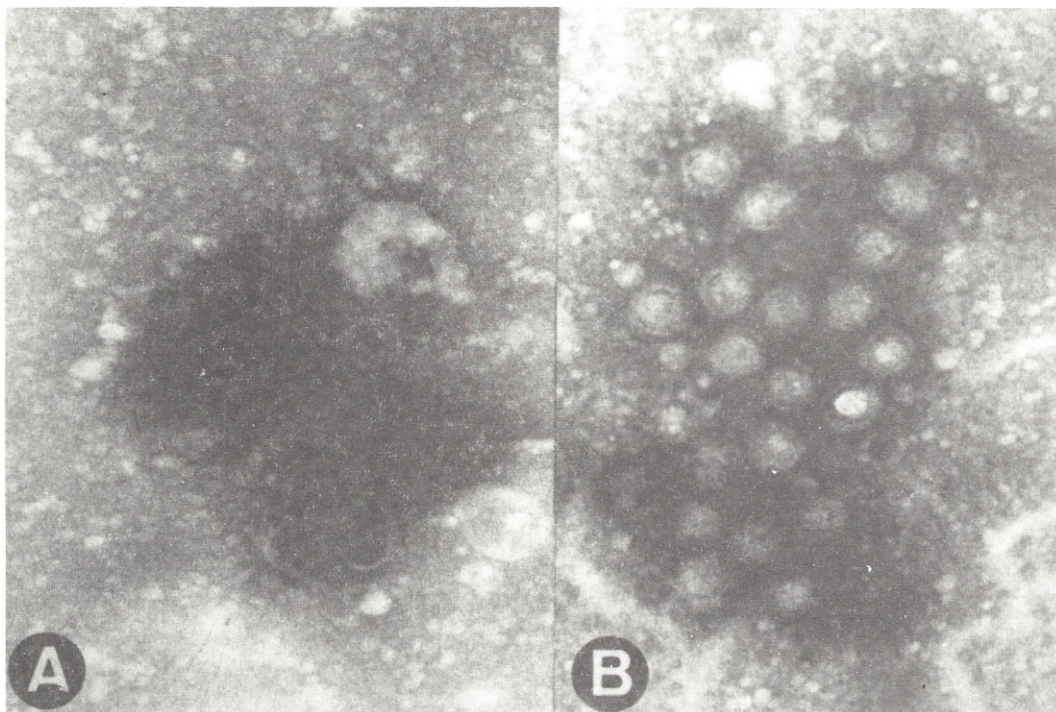


FIGURA 4

Agregados de nucleocapsídeos sem envoltórios, de vírus do grupo Herpes. Em A, capsídeos vazios (sem ácido nucléico) e em B, note-se um grande número de capsídeos com ácido nucléico.

Aumentos: — A-82.000x; B-84.000x

RIALA6/710

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J. & JOAZEIRO P. P. — Rapid diagnosis of Herpesvirus group by electron microscopy: — Atypical observations in the samples of patients with AIDS. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):57-00, 1991.

ABSTRACT: The Electron Microscopy Section of Institute Adolfo Lutz received 129 biological samples (vesicle fluid, genital and anal scrapies lesions, saliva and urine) of patients with AIDS, suspected Herpesvirus infection, in the period of 1986-90, for rapid virus diagnosis by Electron Microscopy. From those samples, 25% (32/129) were positive to Herpesvirus, which some detections showed atypical aspects, such as: — a) great quantity of virus particles; b) detection of two or more nucleocapsids in the same envelope; and c) detection of great aggregates of nucleocapsids without envelopes. This observation could be attributed the immunedepression characteristics of those patients. This relate is considered important by us because it could represent additional dates to study the virus infection in patients with AIDS.

DESCRIPTORS: — Herpesvirus, Electron Microscopy, Opportunistic infection

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. D. — Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 104: 147-58, 1983.
2. ALMEIDA, J. D.; HOWATSON, A. F. & WILLIAMS, M. G. — Morphology of varicella (chicken-pox) virus. *Virology*, 16: 353-5, 1962.
3. BAUER, P. G.; FIALHO, F.; OLIVEIRA, C. A. B.; VALLE, H. A.; SION, F. S. & SA, C. A. M. — Cytomegalovirus in the lung of AIDS. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4., São Lourenço, MG, 1988. *Resumos*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1988. p. 53.
4. BRENNER, S. & HORNE, R. W. — A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta.*, 34: 103-10, 1959.
5. COREY, L. & SPEAR, P. G. — Infections with Herpes simplex viruses (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 314(11): 686-91, 1986.
6. DANIELS, C. A.; LEGOFF, S. G. & NOTKINS, A. L. — Shedding of infectious virus/antibody complexes from vesicular lesions of patients with recurrent Herpes labialis. *Lancet*, 20: 524-8, 1975.
7. DOANE, F. W. & ANDERSON, N. Herpesviridae. In: *Electron microscopy in diagnostic virology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1987. p. 75-7.
8. DREW, W. L. — Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J. infect. Dis.*, 158: 449-56, 1988.
9. DULBECCO, R. & GINSBERG, J. S. — Herpesviruses. In *Virology*. Philadelphia, Harper & Row, 1980. p. 1061-76.
10. FIELD, A. M. — Diagnostic virology using electron microscopy techniques. *Adv. Virus Res.*, 27: 1-69, 1982.
11. GARDNER, P. S. — Rapid virus diagnosis. *J. gen. Virol.*, 36: 1-29, 1977.
12. HENRY, C.; HARTSOCK, R. J.; KIRK, Z. & BEHRER, R. — Detection of viremia in cytomegalovirus-infected infants by electron microscopy. *Am. J. clin. Pathol.*, 69: 435-9, 1978.
13. KIRCHNER, H. Role of immunosuppression in HSV: induced disease. In *Immunobiology of infection with Herpes simplex virus*. Basel, Karger, 1982. p. 22-6 (Monographs in virology, 13).
14. KISIELIUS, J. J.; TANAKA, H.; WEIGL, D. R.; UEDA, M. & JOAZEIRO, P. P. — Diagnóstico rápido de vírus do grupo Herpes pela técnica de coloração negativa. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4., São Lourenço, MG, 1988. *Resumos*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1988. p. 216.
15. LEE, F. K.; NAHMAS, A. J. & STAGNO, S. — Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in infants by electron microscopy. *N. Engl. J. Med.*, 299: 1266-70, 1978.
16. LEITE, J. B. F. L.; MARQUES, A. F.; CIARLINI, M. I.; UEDA, M. & WEIGL, D. R. — Diagnóstico pela microscopia eletrônica do vírus Herpes zoster em pacientes oncológicos. *Rev. paul. Med.*, 93: 101-3, 1979.
17. MONTPLAISIR, S.; BELLONCIK, S.; LEDUC, N.; ONJI, P. A.; MARTINEAU, B. & KURSTAK, E. — Electron microscopy in the rapid diagnosis of cytomegalovirus: ultrastructural observation and comparison of methods of diagnosis. *J. infect. Dis.*, 125: 533-8, 1972.
18. QUINNAN, G. V. Jr.; MASUR, H.; ROOK, A. H.; ARMSTRONG, G.; FREDERICK, W. R.; EPSTEIN, J.; MANISCHEWITZ, J. F.; MACHER, A. M.; JACKSON, L.; AMES, J.; SMITH, H. A.; PARKER M.; PEARSON, G. R.; PARRILLO, J.; MITCHELL, C. & STRAUS, S. E. — Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*, 252: 72-7, 1984.
19. RAWES, W. E. — Herpes simplex virus types 1 and 2 and Herpesvirus simiae. In: LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J. ed. *Diagnostic procedures for: viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, APHA, 1979. chap. 11, p. 138.
20. ROIZMAN, B. — Herpesviridae: a brief introduction. In: *Virology*; edited by B. N. Fields et al. 2nd e. New York, Raven Press, 1990. chap. 64, p. 1787-93.
21. SALLES-GOMES, L. F.; CONCEIÇÃO, B. C.; GALLIZI, Y. D.; FONSECA, Y. M.; WEIGL, D. R. & FIGUEIREDO, M. E. F. — Variola: diagnóstico etiológico de 1967-70, no Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 5-12, 1971.
22. SCHOOLEY, R. T. — Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev. infect. dis.*, 12 (7): S 811-9, 1990.
23. TOMITA, T.; CHIGA, M.; LENAHAN, M. & BALACHANDRAN, N. — Identification of cytomegalovirus infection in acquired immunodeficiency syndrome. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 416: 497-503, 1990.
24. VREESWIJK, J.; FOLKERS, E.; WAGNAAR, F. & KAPSENBERG, J. B. — The use of colloidal gold immunoelectron microscopy to diagnose varicella-zoster (VZV) infections by rapid discrimination between VZV, HSV-1 and HSV-2. *J. virol. Methods*, 22: 255-71, 1988.
25. WILDY, P.; RUSSEL, W. C. & HORNE, R. W. — The morphology of Herpesvirus. *Virology*, 12: 204-22, 1960.
26. WRIGHT, H. T. Jr. & GOODHEART, C. R. — Human cytomegalovirus morphology by negative staining. *Virology*, 23: 419-24, 1964.

AValiação DOS NÍVEIS DE ARSÊNIO, CHUMBO E CÁDMIO EM CORANTES E PIGMENTOS UTILIZADOS EM EMBALAGENS PARA ALIMENTOS NO PERÍODO DE 1982 A 1989*

Neusa Santesso GARRIDO**
Neus Pascuet PREGNOLATTO**
Lúcia Tieco Fukushima MURATA**
Maria Rosa da SILVA**
Maria Cecília Depieri NUNES**
José Leopoldo Ferreira ANTUNES**
Paulo TIGLEA**

RIALA6/711

GARRIDO, N. S.; PREGNOLATTO, N. P.; MURATA, L. T. F.; SILVA, M. R.; NUNES, M. C. D.; ANTUNES, J. L. F. & TIGLEA, P. — Avaliação dos níveis de arsênio, chumbo e cádmio em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos no período de 1982 a 1989. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):63-68, 1991.

RESUMO: Foram analisadas 997 amostras de corantes e pigmentos para embalagens de alimentos, no período de 1982 a 1989, visando a determinar seus teores de arsênio, chumbo e cádmio. Destas amostras, 0,2%, 5,4% e 2,7% apresentaram, respectivamente, níveis de arsênio, chumbo e cádmio acima dos estabelecidos pela legislação brasileira. Apesar da frequência das amostras com teores acima do limite ser baixa, os níveis de chumbo e cádmio encontrados foram muito elevados e variaram de ano para ano. Sugere-se neste estudo a alteração do limite de cádmio aceito pela legislação pertinente, de 0,2 para 0,01% em peso.

DESCRIPTORIOS: arsênio, chumbo e cádmio; corantes e pigmentos para embalagens de alimentos, determinação; espectrofotometria de absorção atômica; embalagens, análise de corantes e pigmentos.

INTRODUÇÃO

Na formulação de materiais plásticos para alimentos, muitos são os aditivos presentes. Entre eles, incluem-se as substâncias que conferem cor e que, de acordo com sua solubilidade no polímero, podem ser classificadas em corantes e pigmentos, sendo os primeiros geralmente solúveis e os outros insolúveis⁴.

A indústria transformadora de plásticos, além de empregar substâncias corantes em pó, usa também os chamados concentrados, ou *masterbatches*,

Tratam-se de misturas homogêneas de resina e substâncias corantes com elevados percentuais destas últimas, entre 10 e 40% ou até mais. Estes concentrados são preparados no estado sólido, em forma de grânulos ou pastilhas, e no estado líquido ou pastoso.⁸

A adição de corantes e pigmentos em materiais para embalagens satisfaz uma exigência de ordem estética, além de servir como proteção contra os efeitos da luz, tanto na embalagem como no alimento.

Dentre os metais que podem estar presentes como contaminantes das substâncias corantes desta-

* Realizado na Seção de Plásticos, Vernizes e Outros Materiais de Embalagens e na Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no VII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, São Paulo, SP, 1991.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

cam-se o arsênio, o chumbo e o cádmio. Apesar de ter meia-vida biológica curta, o arsênio possui toxicidade elevada em suas duas formas mais comuns de apresentação (AsIII e AsV), sendo maior na trivalente^{13,15}. O chumbo e o cádmio não são alterados nos processos metabólicos e possuem elevado efeito acumulativo no organismo, daí sua fundamental importância toxicológica^{3,12}.

Os compostos à base de sais de chumbo e cádmio têm sido largamente empregados como substâncias corantes para diversos tipos de aplicação, devido a seu alto poder de cobertura, baixo custo e excepcional estabilidade à luz e às altas temperaturas, principalmente quando usados em plásticos, onde a substância corante deve resistir à temperatura de elaboração do material; algumas resinas, em especial, requerem temperaturas ao redor de 300°C^{8,11}. Quando presentes em embalagens para alimentos, entretanto, esses compostos podem migrar para o conteúdo, apresentando riscos para a saúde.

É necessário, portanto, verificar e prevenir os eventuais efeitos de contaminação causados pelo emprego dessas substâncias.

A Resolução n° 45/772, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos autoriza o emprego de corantes e pigmentos para coloração de utensílios e equipamentos destinados a entrar em contato com alimentos e bebidas de qualquer natureza, desde que não migrem para o conteúdo, e estabelece os limites de metais tóxicos presentes nessas substâncias.

O teor máximo permitido de arsênio em corantes e pigmentos na legislação brasileira é 0,005% em peso, o de chumbo é 0,01% e o de cádmio é 0,2%², os mesmos valores constantes na legislação belga¹ e italiana⁹. A legislação da França⁵ difere apenas no limite para o cádmio, aceito nessas substâncias apenas até 0,1% em peso. Tem sido questionado o alto valor do limite aceito para o cádmio, posto que sua toxicidade é similar à do chumbo¹³.

Existem controvérsias na literatura quanto ao tipo de controle das substâncias corantes, pois um de seus requisitos de uso é a não migração para o alimento¹⁰. Neste caso, o controle dessas substâncias poderia limitar-se à verificação da migração do corante para o alimento, através de métodos analíticos visuais ou instrumentais⁶. Entretanto, as impurezas tóxicas eventualmente presentes nessas substâncias podem migrar sem alterar o produto, determinando, porém, um efeito de contaminação que deve ser evitado e controlado⁸. Além disso, em termos nacionais, o controle de contaminantes em corantes e pigmentos utilizados em embalagens é ainda mais importante, em função da possibilidade de uso indevido, tanto dos corantes como das embalagens.

O objetivo deste trabalho é verificar a incidência de arsênio, chumbo e cádmio em corantes e pigmentos utilizados como aditivos na formulação de materiais plásticos destinados a entrar em contato com alimentos, no período de 1982 a 1989. Através dos dados obtidos, sugere-se a alteração do limite de cádmio aceito pela legislação brasileira, de 0,2% para 0,01% em peso, equiparando-o ao limite estabelecido para o chumbo.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de 1982 a 1989, foram analisadas 997 amostras de corantes e pigmentos para plásticos destinados a entrar em contato com alimentos, em diferentes formas de apresentação, para a determinação dos teores de arsênio, chumbo e cádmio. Essas amostras foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz por fabricantes e consumidores, a fim de serem submetidas a análises de orientação ou a análises prévias para a obtenção de registro do produto.

Para a determinação do arsênio foi utilizado o método descrito das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁷, sendo a sensibilidade do método empregado de 0,2 mg/kg. Para a determinação de chumbo e cádmio foi efetuada, inicialmente, uma prova semi-quantitativa⁷, com sensibilidade de 2 mg/Kg. Nos casos em que foi constatada a presença de chumbo e/ou cádmio, as amostras foram submetidas à determinação desses elementos por espectrofotometria de absorção atômica com chama, por ser esta uma técnica seletiva e permitir conhecer com exatidão os níveis de ambos os metais, eliminando interferências de outros elementos. As condições experimentais obedeceram à seguinte descrição:

Cerca de 10 gramas da amostra foram pesados com exatidão e submetidos à destruição da matéria orgânica por via seca⁷ em mufla a 400°C, após carbonização em chapa elétrica. O resíduo foi dissolvido em solução de ácido clorídrico 0,1M e transferido para balão volumétrico de 100ml, completando-se o volume com essa solução.

Procedeu-se de modo análogo para a preparação dos padrões de trabalho e dos brancos. Foi efetuada a leitura das soluções em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer, mod. 460, com corretor de deutério e lâmpadas EDL de chumbo e de cádmio nas condições instrumentais indicadas pelo fabricante para os elementos em estudo. O limite de determinação do método utilizado foi 5 mg/kg para o chumbo e 0,25 mg/kg para o cádmio.

Os resultados encontrados foram submetidos a análise estatística comparativa, empregando os seguintes métodos: cálculo do qui-quadrado, teste

“t” de Student, teste “F” de Snedecor e cálculo do coeficiente de correlação entre variáveis¹⁴.

RESULTADOS

Das amostras analisadas, apenas 2 apresentaram teor de arsênio acima do limite estabelecido pela legislação: um corante orgânico rosa (200 mg/kg) e um pigmento inorgânico vermelho (60 mg/kg).

A tabela 1 mostra os valores máximos de chumbo e de cádmio encontrados a cada ano nas amostras analisadas. Mostra, ainda, o número de amostras com teores significativos de chumbo ou cádmio e as frequências anuais de aprovação das amostras.

No caso das amostras contendo excesso de cádmio, foram diferenciadas as quantidades que superaram o limite estabelecido pela legislação vigente² — 2.000 mg/kg — e as quantidades que superaram o limite proposto pelo presente trabalho — 100 mg/kg. A mesma diferenciação foi seguida para o cálculo dos índices das frequências anuais de aprovação das amostras.

Tabela 2 mostra, para cada cor, a distribuição das amostras por faixa de concentração para o chumbo e para o cádmio. Pôde-se verificar que os teores desses metais, na maioria das amostras, estiveram contidos na faixa até 20 mg/kg, sendo, no total, 92,9% para o chumbo e 94,8% para o cádmio.

TABELA 1

Níveis de Pb e Cd em corantes e pigmentos para plásticos destinados a entrar em contato com alimentos, no período de 1982 a 1989

Ano	Número de Amostras	Chumbo (mg/kg) Valor máx.	Cádmio (mg/kg) Valor máx.	Amostras com teores elevados						Frequência de Aprovação (a)	Frequência de aprovação (b)
				Chumbo >100 mg/kg		Cádmio >100 mg/kg		Cádmio >2.000 mg/kg			
				Nº	%	Nº	%	Nº	%		
1982	82	758.377	778.100	2 (2,4)	3 (3,7)	3 (3,7)			93,9	93,9	
1983	155	200	2.500	4 (2,6)	2 (1,2)	1 (0,6)			96,8	96,8	
1984	123	(c)	(c)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)			100,0	100,0	
1985	150	15.243	33.934	13 (8,7)	11 (7,3)	8 (5,3)			86,0	84,7	
1986	94	16.000	138.600	6 (6,4)	4 (4,2)	3 (3,2)			90,4	90,4	
1987	50	12.500	88.000	4 (8,0)	3 (6,0)	3 (6,0)			86,0	86,0	
1988	158	4.900	19.100	14 (8,9)	11 (6,9)	4 (2,5)			88,6	85,4	
1989	185	13.200	39.000	11 (5,9)	13 (7,1)	5 (2,7)			91,4	87,0	

(a) De acordo com os limites para Pb, Cd e As estabelecidos pela legislação brasileira².

(b) De acordo com os limites para Pb, Cd e As propostos no presente trabalho.

(c) Valor abaixo do limite de sensibilidade do método.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A contaminação por arsênio das substâncias corantes analisadas foi muito pequena: apenas 0,2% das amostras apresentaram teor desse elemento acima do permitido pela legislação vigente.

A análise estatística comparativa entre os períodos 1982-84 e 1985-89 evidenciou uma diminuição significativa ($p < 0,005$) nas frequências de aprovação das amostras, registrando um decréscimo do padrão de qualidade dos corantes e pigmentos no que diz respeito à presença de chumbo e cádmio, a partir de meados da década passada. Essa constatação aponta para a necessidade de atenção, por parte das autoridades sanitárias, aos fatores que possam ter determinado essa perda de qualidade.

Os níveis máximos de chumbo e de cádmio, determinados a cada ano, foram bastante elevados,

o que pode sugerir que a presença desses metais nos corantes e pigmentos não fosse apenas proveniente de contaminação, mas sim devida à utilização desses elementos como base dos produtos apresentados.

Apesar das frequências anuais de aprovação das amostras serem elevadas, o alto nível de contaminação das que foram condenadas é fator de preocupação e reforça a hipótese acima. Produtos com alto nível de contaminação por chumbo ou cádmio não são indicados para embalar ou acondicionar alimentos, principalmente os de tipo ácido, para os quais é maior o risco de extração desses metais e sua migração para o produto alimentício.

Com relação à distribuição das amostras por nível de chumbo, as cores branca, cinza e preta apresentaram os melhores perfis, com quase todas as

TABELA 2

Distribuição dos níveis de chumbo e cádmio por faixa de concentração em função da cor.

	Metais analisados (mg/kg)	CORES																									
		Branca (269)		Vermelha (167)		Azul (114)		Verde (54)		Amarela (176)		Marrom (31)		Preta (79)		Laranja (28)		Violeta (28)		Rosa (12)		Bege (28)		Cinza (11)		Total (977)	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CHUMBO	≤ 20	269	(100,0)	147	(88,0)	111	(97,4)	42	(77,8)	155	(88,1)	29	(93,5)	77	(97,5)	24	(85,7)	27	(96,4)	10	(83,3)	24	(85,7)	11	(100,0)	926	(92,9)
	21-50	0	(0,0)	2	(1,2)	0	(0,0)	4	(7,4)	3	(1,7)	1	(3,2)	1	(1,3)	1	(3,6)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	12	(1,2)
	51-100	0	(0,0)	3	(1,8)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,6)	0	(0,0)	1	(1,3)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	5	(0,5)
	> 100	0	(0,0)	15	(9,0)	3	(2,6)	8	(14,8)	17	(9,7)	1	(3,2)	0	(0,0)	3	(10,7)	1	(3,6)	2	(16,7)	4	(14,3)	0	(0,0)	54	(5,4)
CÁDMI	520	269	(100,0)	163	(97,6)	112	(98,2)	50	(92,6)	158	(89,8)	28	(90,3)	78	(98,7)	23	(82,1)	27	(96,4)	11	(91,7)	16	(57,1)	10	(90,9)	945	(94,8)
	21-50	0	(0,0)	1	(0,6)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(3,6)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(3,6)	0	(0,0)	3	(0,3)
	51-100	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	2	(3,7)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(9,1)	3	(0,3)
	101-2000	0	(0,0)	0	(0,0)	2	(1,8)	0	(0,0)	7	(4,0)	1	(3,2)	1	(1,3)	4	(14,3)	1	(3,6)	0	(0,0)	3	(10,7)	0	(0,0)	19	(1,9)
	> 2000	0	(0,0)	3	(1,8)	0	(0,0)	2	(3,7)	11	(6,3)	2	(6,5)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(8,3)	8	(28,6)	0	(0,0)	27	(2,7)

amostras na faixa até 20 mg/kg. De modo complementar, os piores perfis foram apresentados pelas cores verde, rosa, bege e laranja, com distribuição significativamente diferente ($p < 0,05$) do perfil médio.

No que diz respeito ao nível de cádmio, verificou-se que este metal esteve presente em menor número de amostras, quando comparado com o chumbo. Foram as cores branca, preta e violeta que apresentaram os melhores perfis de distribuição, também com quase todas as amostras na faixa até 20 mg/kg. Registraram os piores perfis as cores bege, laranja, verde e rosa, com distribuição das amostras significativamente diferente ($p < 0,05$) do perfil médio.

Não houve nenhum caso de contaminação significativa por mais de um elemento numa mesma

amostra, quando considerado o limite estabelecido pela legislação vigente. Quando considerado o limite proposto no presente trabalho, cinco amostras apresentaram, simultaneamente, altos índices de contaminação por chumbo e por cádmio.

A proposta de alteração do limite máximo aceito pela legislação, de 2.000 para 100 mg/kg, permite tornar mais segura a utilização de corantes e pigmentos para plásticos, do ponto de vista da saúde individual e coletiva. Outrossim, essa alteração sequer acarretaria maiores dificuldades para os fabricantes envolvidos na produção desses aditivos para plásticos, posto que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os perfis de aprovação segundo os dois critérios, tendo sido bastante elevada a correlação positiva entre eles.

RIALA6/711

GARRIDO, N.S.; PREGNOLATTO, N.P.; MURATA, L.T.F.; SILVA, M.R.; NUNES, M. C.D.; ANTUNES, J.L.F. & TIGLEA, P. — Evaluation of arsenic, lead and cadmium levels in pigments and colours utilized in food packages, for the period 1982-1989. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):63-68, 1991

ABSTRACT: 997 samples of pigments and colours for food packages were analysed for their arsenic, lead and cadmium contents, for the period 1982-1989. The levels for these contaminants showed 0.2% of samples with arsenic above the limits allowed by law, 5.4% with lead and 2.7% with cadmium. Although only few samples showed high levels of contamination, the contents of lead and cadmium found were very high and changed year by year. In this paper, authors suggest the brazilian legislation should change the limit accepted for cadmium contamination, from 0.2 to 0.01% in weight.

DESCRIPTORS: arsenic, lead and cadmium; pigments and colours for food packages, determination; flame atomic absorption spectrophotometry; package pigments and colours analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BÉLGICA. Leis, decretos, etc. Arrêté royal du 25 août 1976, du Ministère de la Santé Publique et de la Famille. *Moniteur Belge*, Bruxelles, 24 sept. 1976. p. 12029-82. Complète l'arrêté royal du 12 sept 1972 relatif à la fabrication, au commerce et à l'emploi des objets et matières destinés à être mis en contact avec les denrées et substances alimentaires.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução 45/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 1º fev. 1978. Seção I, pt I, p. 1781-95. Aprova as listas de polímeros, resinas e respectivos aditivos e regulamenta seu emprego na elaboração ou revestimento de embalagens...
3. 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.
4. ELKIND, R. — *Plásticos: produção, características e utilização*. (São Paulo), FDTE/EPUSP/IPT, s.d.. Cap. 6, p. 6.12-6.20.
5. FRANÇA. Leis, decretos, etc. Circulaire n. 176 du 2 déc. 1959. *Journal Officiel de la République Française*. Paris, 30 déc. 1959. p. 109. Relative aux pigments et colorants des matières plastiques et emballages.
6. GARLANDA, T. — Migration des matières colorantes. *Ann. Inst. Super. Sanità.*, 8, 461-73, 1972.
7. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, V.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. p. 66, 462-3.
8. ITALIA, A. & BARUCCI, U. — Aspetti sanitari, tecnici e normativi riguardanti i pigmenti e i coloranti. In: CONVEGNO DI STUDIO SUGLI ASPETTI SANITARI, TECNICI E NORMATIVI DEI MATERIALI IN CONTATO CON ALIMENTI, Roma, 1970. *Atti*. Roma, Società

GARRIDO, N. S.; PREGNOLATTO, N. P.; MURATA, L. T. F.; SILVA, M. R.; NUNES, M. C. D.; ANTUNES, J. L. F. & TIGLEA, P. — Avaliação dos níveis de arsênio, chumbo e cádmio em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos no período de 1982 a 1989. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):63-68, 1991.

- Italiana di Scienza dell'Alimentazione, 1970. p. 263-96.
9. ITÁLIA. Leis, decretos, etc. Decreto ministeriale 21 marzo 1973. *Gazzeta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Roma, 20 aprile 1973. Pt. I (supl. 104) p. 132-68. Disciplina igienica degli imballaggi, recipienti, utensili, destinati a venire in contatto con le sostanze alimentari o con sostanze d'uso personale.
10. McCOWIN, G.L. — Non-migrating polymer colors don't require FDA approval. *Food Chem. News*: 29-32, may 9, 1988.
11. MILES, D.C. & BRISTON, J.H. — *Tecnologia dos Polímeros*. São Paulo, EDUSP/Polígono, 1975. p. 434.
12. PIOTROWSKI, J.K. & COLEMAN, D.O. — *Environmental hazards of heavy metals: summary evaluation of lead, cadmium and mercury*. London, MARC/GEMS, 1980. p. 1-18. (MARC report n. 20).
13. SAX, N.I. — *Dangerous properties of industrial materials*. 5th ed. New York, Van Nostrand/Reinhold, 1979. p. 388-90, 455-9, 765-71.
14. SPIEGEL, M.R. — *Estatística*. São Paulo, McGraw-Hill, 1978. p. 310-30.
15. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *Arsenic*. Genève, WHO, 1981. 174 p. (Environmental Health Criteria, 18).

Recebido para publicação em 18 de dezembro de 1990.

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS*

Helôisa H. C. BARRETTO**
Odete N. K. INOMATA**
Vera R. R. LEMES**

RIALA6/712

BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K.; LEMES, V.R.R. — Estudo comparativo de métodos para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):69-74 — 1991.

RESUMO: O desenvolvimento de métodos analíticos para detectar resíduos de pesticidas em alimentos dá ênfase à técnicas para análise de multirresíduos devido aos inúmeros princípios ativos à disposição no mercado. A técnica do A.O.A.C. utilizada pelo laboratório de análise de resíduos do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo desde as suas primeiras pesquisas na área, é hoje praticamente inviável devido ao seu alto custo. Para contornar o problema foi necessário estabelecer nova metodologia que satisfizesse requisitos como: facilidade e rapidez de execução, reprodutibilidade, sensibilidade e baixo custo. Dos métodos estudados o que mais se adequou às necessidades laboratoriais foi o de Steiwandter. Para avaliação deste método frente ao A.O.A.C. foi feito um estudo comparativo, mostrando resultados plenamente satisfatórios.

DESCRITORES: alimentos, determinação de resíduos de pesticidas organoclorados leite, manteiga, ovos, resíduos, determinação, métodos, estudo comparativo.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os dados de resíduos de pesticidas em alimentos são escassos embora haja trabalhos publicados desde 1971^{1,5}.

Apesar da proibição dos organoclorados³ continuamos a detectá-los, principalmente em produtos gordurosos de origem animal, devido a sua persistência e lipossolubilidade.

A análise de pesticida a nível de traços requer um ou mais procedimentos de extração e purificação, dependendo do tipo da amostra, da sensibilidade e seletividade dos métodos de detecção disponíveis⁸.

Nos últimos anos, diferentes procedimentos de extração e purificação de amostras gordurosas para determinação de multirresíduos de pesticidas organoclorados tem sido objeto de muitos estudos.

O método que vinha sendo utilizado desde 1969 no Instituto Adolfo Lutz era o da A.O.A.C.² que consiste de várias etapas analíticas: extração da gordura partição com três solventes e cromatografia de adsorção com floristil. O uso desta metodologia requer um gasto maior de tempo, grande quantidade de solventes e, como consequência o custo da análise se torna mais alto.

Procurando métodos onde a extração e purificação fossem feitas em uma única etapa, viabilizando condições para maior controle de resíduos de pesticidas nos alimentos foi feito um estudo comparativo entre o método de Steiwandter H.⁷ e o método oficial da A.O.A.C. em amostras de manteiga, leite e ovos.

O método de Steiwandter foi usado pelo laboratório do Instituto Adolfo Lutz nas análises das amostras de óleo e manteiga enviadas pelo Programa de Controle de Qualidade Analítica coordenado

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no XII Encontro de Analistas de Resíduos de Pesticidas, São Paulo, 1988.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

pelo Joint FAO/WHO Food Contamination Monitoring Programme Analytical Quality Assurance⁶ e também pelo Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas-Brasil. Os resultados nos dois programas foram amplamente satisfatórios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras:

O estudo comparativo dos métodos propostos foi feito através da análise de cinco amostras de manteiga, cinco de leite pasteurizado tipo B e cinco de ovos de galinha comercializados na cidade de São Paulo.

a) Método de Steiwandter

Material

Estufa

Rotavapor

Coluna cromatográfica com torneira de Teflon e placa porosa, de 20 mm de diâmetro interno, 300 mm de comprimento com reservatório de 200 ml.

Almofariz com pistilo

Cromatógrafo C.G. 370 com detector de captura de elétrons, fonte de tritium, equipado com coluna espiralada de vidro de 6 pés de comprimento por 1/8 de polegada de diâmetro interno, com fase estacionária, 1,5% OV 17 + 1,95% OV 210 em Chorosorb Q II 100/120 mesh, nas seguintes condições: temperatura da coluna, 206°C; temperatura do injetor, 216°C; temperatura do detector, 225°C; fluxo de Nitrogenio, 40 ml/min. A sensibilidade do aparelho foi ajustada de forma a conseguir uma deflexão de aproximadamente 60% da escala do papel do registrador com 40 pg de Aldrin.

Reagentes

Hexano grau residuo

Silica gel 60, tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM)

Sulfato de Sódio anidro granulado

Ativação da silica gel — aquecida a 130°C por uma noite e estocada em dessecador.

Silica gel a 10% — e parcialmente desativada com 10% de água desmineralizada.

Eluente — Hexano: Diclorometano na proporção 4:1 em volume.

Procedimento

Manteiga

Extrair a gordura através de refluxo em Soxhlet com hexano. Pesar 1 g da gordura e diluir com Hexano em balão volumétrico de 25 ml. Transferir uma alíquota de 10 ml da solução obtida, equivalente a 0,4 g para uma coluna cromatográfica, con-

tendo 15 g de silica gel parcialmente desativada 13,5 g de silica + 1,5 g de água desmineralizada). Eluir os pesticidas organoclorados com 200 ml do eluente.

Leite

Homogeinizar 10 g da amostra de leite com 15 g de silica gel em almofariz. Transferir o pó resultante da mistura para coluna cromatográfica contendo 15 g de silica gel desativada e eluir com o eluente.

Ovo

Homogeinizar as claras e as gemas. Tomar 5 g de mistura e adicionar 5 g de água. Adicionar 15 g de silica gel. Misturar em um almofariz. Transferir o pó resultante da mistura para coluna cromatográfica contendo 15 g de silica gel desativada e eluir com o eluente.

Concentrar os eluatos em rotavapor a aproximadamente 2 ml. Adicionar aproximadamente 5 ml de Hexano. Concentrar novamente para eliminação do Diclorometano. Completar o volume e injetar no cromatógrafo.

b) Método do A.O.A.C.

A extração dos pesticidas e a purificação dos extratos foi feita conforme A.O.A.C. As condições cromatográficas foram as mesmas usadas no método de Steiwandter, sendo que a sensibilidade foi ajustada de forma a obter uma deflexão de aproximadamente 60% da escala do registrador com 150 pg de Aldrin para amostras de manteiga e leite, e com 40 pg de Aldrin para amostras de ovos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de recuperação feito apenas com padrões dos diferentes princípios ativos dos pesticidas organoclorados em dois níveis de concentração encontram-se nas tabelas 1 e 2. Foi utilizada uma mistura de padrões adequada a cada método, variando de 50 à 900 ng para o da A.O.A.C. e de 10 a 90 ng para o de Steiwandter.

A recuperação média obtida pelos dois métodos estão dentro dos limites aceitáveis, mostrando equivalência entre eles.

As tabelas 3, 4 e 5 mostram os resultados obtidos na análise de parte das amostras homogeinizadas de manteiga, leite e ovos. Nelas foram detectados resíduos de alfa HCH, gama HCH, p-p'DDE, o-p'DDT, p-p'DDT e Dieldrin.

Das 120 determinações de pesticidas organoclorados efetuados 53,33% foram iguais nos dois métodos, 43,33% diferiram em até 100% e 3,33% apresentaram uma diferença maior que 100%. Entretanto, quando se trabalha com valores na ordem de 0,01 mg/kg(ppm) de resíduos de pesticidas orga-

noclorados em alimentos o erro é plenamente aceitável⁴.

A tabela 6 mostra a porcentagem de recuperação para cada pesticida nos níveis de adição de 20-80 ng/g à outra parte das amostras e de acordo com a sensibilidade do método.

Devido aos resultados das recuperações e das amostras estudadas serem considerados satisfatórios, foi introduzido na Seção de Aditivos e Pesti-

cidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, o método de Steiwandter para amostras gordurosas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Walkyria H. Lara que foi chefe da Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais por ter intermediado o estágio de Heloisa H. B. de Toledo nos laboratórios do G. T. Z./Alemanha que utiliza o método de Steiwandter.

RIALA6/712

BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K.; LEMES, V.R.R. — Comparative study of methods to determination of chlorinated pesticide residues. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 69-74, 1991.

ABSTRACT: Development of analytical methods for pesticide residues determination in food require multiresidues methodology due many active ingredient. The technic mentioned by A.O.A.C. has being used in laboratory of "Instituto Adolfo Lutz. São Paulo" since its firsts researches and occasioned high expenses turning almost impossible its realization. In order to resolve the problem it was necessary studying a new methodology wich according the requisites: facilitate, quickly of execution, reproductibility, sensibility and lower expense. Between the methods studied the most suitable for our necessities it was Steiwandter, H. and it is being used since than. For evaluatin the methodology it was make a comparison with the method of the A.O.A.C. giving satisfactory results.

DESCRIPTORS: food, chlorinated pesticide residues determination in, chlorinated pesticide in milk, butter, egg, residues, determination, methods, comparative study.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W.; BARRETO, H.H.C. — Resíduos de pesticidas clorados em leite consumido em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 31, 13-20, 1971.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 12th ed. Washington, A.O.A.C., 1984, p. 536-8 seção 29.011 e, 29.012 b, 29.012 c, 29.014, 29.015.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Portaria n° 329, de 02 de setembro de 1985 do Ministério da Agricultura. Diário Oficial. Brasília, 03 de setembro de 1985. Seção I, pt. I, p. 12941. Proíbe em todo o território nacional, a comercialização, uso e distribuição dos produtos organoclorados destinados a agropecuária.
4. CARL, M. — Internal laboratory quality control in the routine determination of chlorinated pesticide residues. In INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY. 4°, Zurich, 1978. Papers; ed. H. Geissbuhler. Oxford, Pergamon Press, 1979, p. 660-3.
5. LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C.; TAKAHASHI, M.Y. — Resíduos de pesticidas clorados em conservas de carne bovina. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 31, 63-70, 1971.
6. SLORACH, S.A. & VAZ, R. — Report of the fourth analytical quality assurance: exercise on organochlorine compounds. In: JOINT UNEP/FAO/WHO FOOD CONTAMINATION MONITORING PROGRAMME. — Analytical quality assurance studies, 1985-1987. Geneva, WHO, 1988.
7. STEIWANDTER, H. — Contributions to silica gel application in pesticide residue analysis. III. An on-line Method for Extracting and Isolating Chlorinated Hydrocarbon Pesticides and Polychlorinated Biphenyls (PCB's) from milk and dairy products. Fresenius Z. Anal. Chem., 312:342-5, 1982.
8. WALTERS, S. M. — Cleanup of samples. In ZWEIG, G & SHERMA, J., ed. — Analytical methods for pesticides and plant growth regulators. Orlando, Academic Press, 1986, v. 15, p. 67, 80.

Recebido para publicação em 05 de fevereiro de 1991.

TABELA 1

Recuperação de pesticidas organoclorados pelo método da A.O.A.C.

	ng ADICIONADOS	% DE RECUPERAÇÃO	% MÉDIA
HCB	300	75	85,0
	50	95	
alfa HCH	300	90	87,5
	50	85	
gama HCH	300	90	87,5
	50	85	
beta HCH	600	80	80,0
	100	80	
Aldrin	600	80	82,5
	100	85	
Dieldrin	600	75	77,5
	100	80	
Endrin	600	75	85,0
	100	95	
Heptaclor	600	85	80,0
	100	75	
Heptaclor Epoxi	600	95	92,5
	100	90	
p-p' DDE	600	95	95,0
	100	95	
o-p' DDT	900	90	92,5
	200	95	
p-p' DDT	900	90	92,5
	200	95	
p-p' DDD	900	85	90,0
	200	95	
Mirex	900	75	82,5
	200	90	

TABELA 2

Recuperação de pesticidas organoclorados pelo método de Steiwandter, H.

	ng ADICIONADOS	% DE RECUPERAÇÃO	% MÉDIA
HCB	30	85	90,0
	10	95	
alfa HCH	30	90	92,5
	10	95	
gama HCH	30	90	92,5
	10	95	
beta HCH	60	75	80,0
	20	85	
Aldrin	60	90	85,0
	20	80	
Dieldrin	60	85	87,5
	20	90	
Endrin	60	80	85,0
	20	90	
Heptaclor	60	95	92,5
	10	90	
Heptaclor Epóxi	60	90	90,0
	20	90	
p-p' DDE	60	95	95,0
	20	95	
o-p' DDT	90	95	92,5
	40	90	
p-p' DDT	90	95	92,5
	40	90	
p-p' DDD	90	95	92,5
	40	90	
Mirex	90	95	90,0
	40	85	

TABELA 3

Níveis de resíduos de pesticidas organoclorados na gordura da manteiga ppm(mg/kg)

Amostras	% de gordura	Métodos	alfa HCH	gama HCH	beta HCH	p-p' DDE	o-p' DDT	p-p' DDD	p-p' DDT	Dieldrin
A	81,3	AOAC	0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,01	0,01	0,02	< 0,01	< 0,01	0,02	< 0,01
B	81,3	AOAC	0,01	< 0,01	0,01	0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,02	< 0,01
C	82,0	AOAC	0,01	0,01	0,01	0,04	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,01	0,02	0,04	0,01	< 0,01	0,01	0,01
D	84,0	AOAC	0,01	0,01	0,01	0,04	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	< 0,01	0,02	0,02
E	83,3	AOAC	0,01	0,01	0,01	0,03	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,02	0,01	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01

TABELA 4

Níveis de resíduos de pesticidas organoclorados na gordura do leite ppm(mg/kg)

Amostras	% de gordura	Métodos	alfa HCH	gama HCH	beta HCH	p-p' DDE	o-p' DDT	p-p' DDD	p-p' DDT	Dieldrin
A	3,6	AOAC	0,01	< 0,01	0,01	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,01	< 0,01	0,02	0,01	< 0,01	0,01	0,02
B	3,6	AOAC	0,01	< 0,01	0,02	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	0,02	< 0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,01	0,01
C	3,4	AOAC	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	< 0,01	0,01	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,02
D	3,6	AOAC	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	< 0,01	0,01	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,02
E	3,8	AOAC	0,02	< 0,01	0,01	0,03	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01
		Steiwandter	0,01	< 0,01	0,01	0,04	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,02

TABELA 5

Níveis de resíduos de pesticidas organoclorados na gordura do ovo ppm(mg/kg)

Amostras	% de gordura	Métodos	alfa HCH	gama HCH	beta HCH	p-p' DDE	o-p' DDT	p-p' DDD	p-p' DDT	Dieldrin
A	10,1	AOAC	0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,01	< 0,01
		Steiwandter	< 0,01	0,01	< 0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,02	0,01
B	8,3	AOAC	0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,03	< 0,01
		Steiwandter	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,02	< 0,01
C	9,2	AOAC	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,02	< 0,01	0,02	< 0,01
		Steiwandter	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01
D	9,7	AOAC	0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,03	< 0,01
		Steiwandter	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,02	< 0,01
E	8,1	AOAC	0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,04	0,01
		Steiwandter	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,02	0,01

TABELA 6

Recuperação de pesticidas organoclorados adicionados nas amostras

	concentração adicionada ng/g	MANTEIGA		LEITE		OVO	
		AOAC	Steiwandter	AOAC	Steiwandter	AOAC	Steiwandter
		%	%	%	%	%	%
HCB	20	80	84	70	83	86	87
alfa HCH	20	84	83	80	80	87	98
gama HCH	20	96	96	85	91	85	81
beta HCH	40	84	88	93	83	83	88
Aldrin	40	82	94	84	78	82	89
Dieldrin	40	94	100	78	88	96	94
Endrin	40	97	100	100	95	100	93
Heptaclor	40	84	88	93	83	83	88
Heptaclor Epoxi	40	102	93	94	97	97	94
p-p' DDE	40	92	85	100	103	82	90
o-p' DDT	80	94	100	97	107	96	96
p-p' DDT	80	100	107	106	105	91	94
p-p' DDD	80	103	103	100	100	100	94
Mirex	80	77	100	76	105	82	94

DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) EM ÓLEO DE SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) BRASILEIRA E EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE ÓLEO DE SARDINHA*

Elza Schwarz Gastaldo BADOLATO**
José Byron de CARVALHO**
Mário TAVARES**
Sabria AUED-PIMENTEL**

RIALA6/713

BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. de; TAVARES, M. & AUED-PIMENTEL, S. —
Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo
de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo
de sardinha. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2):75-81, 1991.

RESUMO: Os óleos de peixe são a maior reserva natural dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), aos quais são atribuídos benefícios na prevenção e tratamento de certas doenças cardiovasculares. A crescente oferta no comércio e solicitação de registros de suplementos alimentares à base de óleos de peixe, levou os autores a verificar sua qualidade. Foram analisadas 19 amostras de suplementos alimentares à base de óleo de sardinha, importados da Inglaterra e encapsulados no Brasil, e 8 amostras de óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira, extraído em laboratório. Foram determinadas as porcentagens dos ácidos EPA e DHA sobre o total dos ácidos graxos, através de cromatografia em fase gasosa, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida Carbowax 20 M. Em todas as amostras foram determinados também os índices de iodo (Wijs) e de refração a 40°C. Os resultados mostraram que apenas uma das amostras de suplementos alimentares estava completamente em desacordo com a fórmula-padrão declarada, e o índice de iodo correspondente muito baixo. Por outro lado, os óleos de sardinha brasileira apresentaram baixos valores de EPA e dos índices de iodo e de refração; entretanto, 6 entre 8 amostras analisadas revelaram teores de DHA acima daquele convencionalmente adotado para os suplementos (120 mg/g), compensando os baixos valores de EPA. Sendo assim, o óleo de sardinha brasileira pode ser considerado de boa qualidade como matéria-prima para a elaboração daqueles suplementos.

DESCRITORES: óleo de sardinha, determinação de ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico em; óleo de sardinha, índices de iodo e de refração; suplementos alimentares, determinação de ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico em; suplementos alimentares, índices de iodo e de refração; cromatografia em fase gasosa.

INTRODUÇÃO

Os óleos de peixe têm sido utilizados na formulação de alimentos há muito tempo, principalmente de margarinas^{6,16}. Sua produção atingiu a 1,41 milhões de toneladas métricas em 1987/88, correspondendo ao 9º lugar da produção mundial de óleos²².

Estruturalmente, os óleos de peixe diferem em muito dos outros óleos porque contêm uma grande variedade de ácidos graxos com 20 a 22 átomos de carbono, altamente insaturados, destacando-se o eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), da série ômega-3^{25,26,30}.

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos e no Laboratório da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P. Apresentado no "International Meeting on Fats & Oils Technology", Campinas, 1991.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Estes ácidos são característicos dos óleos de peixe, não ocorrendo em outros óleos em quantidades além de traços^{25,28}.

Os peixes de qualquer espécie apresentam composição em ácidos graxos bem diversificada devido a vários fatores, como alimentação disponível, hábitos alimentares, idade, sexo, temperatura da água, localização geográfica e estação do ano^{14,27,28}. Face a essa composição tão variada, os óleos de peixe são de considerável interesse bioquímico, metabólico, nutricional e farmacêutico²⁵, tendo se intensificado as pesquisas científicas justamente pelos numerosos benefícios a eles atribuídos, em particular a seus ácidos EPA e DHA^{1,31}.

Os efeitos benéficos ao organismo humano dos ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) dos óleos de peixe, foram especialmente enfocados em alguns eventos científicos internacionais, sendo o pioneiro realizado nos Estados Unidos, em 1985²¹, além de outros dois ocorridos no Canadá e na Itália, em 1988¹². Esses efeitos estão associados ao seu papel na integridade das membranas biológicas, à sua capacidade de reduzir o teor de lipídios séricos e à sua conversão aos compostos chamados eicosanóides, que apresentam uma ação direta sobre a fisiologia e sistema vascular^{8,18}.

Os efeitos acima referidos têm sido mais evidentes nas populações cujas dietas têm baixo teor de gordura, como os japoneses das vilas de pescadores, com baixa incidência de problemas cardíacos, e os esquimós¹⁵. Em adição, cabe destacar que os casos de esclerose múltipla são raros nas áreas litorâneas, onde é fácil o consumo de peixes²¹ e que o interesse científico pelo presumível potencial hipolipidêmico e anti-aterogênico dos ácidos graxos da série ômega-3, surgiu de um estudo com esquimós⁸.

Hoje, já se pode afirmar que há grande evidência de que as dietas à base de PUFAs podem reduzir o desenvolvimento de doenças coronarianas^{11,19}. Assim, nos últimos anos, a maior parte das pesquisas com os ácidos graxos ômega-3 objetiva determinar seus efeitos imunológicos e anti-inflamatórios, principalmente nos casos de asma, artrite reumatóide e autoimunidade²⁰. De concreto, sabe-se que o consumo de peixe pode ser benéfico à saúde a longo prazo, através de mecanismos ainda desconhecidos^{8,20}.

Por outro lado, alguns efeitos colaterais são relacionados ao consumo de óleos de peixe, entre os quais a ocorrência de manchas amarelas na pele, "doença da pele amarela", a inflamação do tecido adiposo, "esteatite"⁷, e o provável aumento da susceptibilidade a certas infecções¹⁷.

A par das precauções que devem ser tomadas quanto ao consumo de óleos de peixe, importante é saber as doses em que eles devem ser oferecidos

aos organismos, particularmente gestantes, lactentes e crianças, para as quais a ingestão dos PUFAs é indispensável²¹.

Diante dos efeitos benéficos e dos efeitos colaterais devidos à ingestão dos ácidos graxos ômega-3 e também à insuficiência de dados experimentais sobre o assunto, o "Food and Drug Administration" (FDA) proibiu a comercialização de óleos de peixe como medicamento nos Estados Unidos, enquadrando-os na categoria de suplemento alimentar²³.

No Brasil, a oferta no comércio de suplementos alimentares à base de óleo de peixe, contendo os ácidos EPA e DHA, encapsulados, vem crescendo ultimamente, bem como as solicitações de análises no Instituto Adolfo Lutz para fins de registro de novas marcas desses produtos no Ministério de Saúde. De acordo com o declarado pelos interessados, o óleo, geralmente de sardinha, é importado da Inglaterra e apenas encapsulado em nosso país. A fórmula convencional garante que o produto contém 180 mg de EPA e 120 mg de DHA por grama. Em alguns casos, tem a adição de vitamina E ou tocoferol como antioxidante.

Com relação aos teores de EPA e DHA, a literatura¹⁰ refere que a gordura dos peixes mais comuns tem de 8 a 12% do primeiro e de 10 a 20% do outro ácido sobre o total de ácidos graxos. Especificamente para o óleo de sardinha, um dos poucos trabalhos publicados sobre o produto brasileiro informa que a soma dos dois ácidos atingiu a 37,73%, não os discriminando individualmente, empregando-se a espécie *Sardinella aurita*²⁴, enquanto que para o óleo de sardinha japonês alcançou 29,0% (EPA, 16,8%; DHA, 12,2%)¹⁵, e para o americano 37,1% (EPA, 11,3%; DHA, 25,8%)¹⁰. Se aquele teor de 37,73% pudesse ser generalizado para o óleo de sardinha brasileiro, seria o caso de se repensar a importação do óleo, aqui comercializado como suplemento alimentar, baseado na teoria de que os peixes de águas mais frias, como as da Inglaterra, sejam mais ricos em PUFAs do que os de regiões tropicais, como o Brasil³¹, teoria, diga-se de passagem, contestada por BIMBO⁶.

No Brasil, a sardinha é o peixe mais popular, representando cerca de 50% da comercialização de pescado no Entrepósito Terminal de São Paulo (CEAGESP), o maior do país³. Na Região Sudeste, a espécie mais explorada é a sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)⁴. Sobre óleo de sardinha brasileira, praticamente não existem dados publicados sobre a sua composição e produção.

Considerando os fatos anteriormente abordados, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a qualidade de suplementos alimentares à base de óleo de sardinha, disponíveis no mercado ou em proces-

so de registro no Ministério da Saúde, bem como óleo de sardinha brasileira, extraído em laboratório da espécie *Sardinella brasiliensis*, através da determinação dos seus conteúdos dos ácidos EPA e DHA e, complementarmente, dos índices de iodo e de refração, visto que estes estão correlacionados com o grau de insaturação dos ácidos graxos⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 19 amostras de suplementos alimentares à base de óleo de sardinha, importados da Inglaterra e encapsulados no Brasil, sendo 10 delas enviadas para análise no Instituto Adolfo Lutz pelos próprios importadores, para fins de registro do produto no Ministério da Saúde, e 9 adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, todas estas de diferentes lotes. As suas respectivas marcas estão representadas por letras do alfabeto (marcas iguais estão representadas pela mesma letra). Foram analisadas também 8 amostras de óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira, extraído em laboratório. As sardinhas foram adquiridas no comércio das cidades de São Paulo e Santos, em diferentes épocas do ano.

O óleo das sardinhas foi extraído através de adaptação do método de STANSBY & LEMON²⁹, que consiste em: pesar cerca de 40 g da sardinha, sem cabeça e sem cauda, transferir para um frasco Erlenmeyer de 500 ml e adicionar 50 g de sulfato de sódio anidro e 200 ml de éter etílico. Agitar por 60 minutos. Decantar e filtrar para um balão de fundo chato de 300 ml, com boca esmerilhada. Evaporar o filtrado num evaporador rotativo e filtrar, obtendo-se o óleo para a execução das análises.

A metilação e análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de todas as amostras foi efetuada conforme as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹³. Foi usado um cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, acoplado a um integrador. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida Carbowax 20 M, de 25 metros. Foram observadas as seguintes temperaturas de operação: injetor, 260°C; detector, 260°C; coluna, programada de 60 a 260°C.

Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaheptaenóico (DHA) foram identificados por meio de um padrão qualitativo de uma mistura de ésteres de ácidos graxos polinsaturados "PUFA-1 SUPELCO". A quantificação dos mesmos foi realizada por normalização de área.

Em todas as amostras, foram determinados ainda os índices de iodo (método de Wijs) e o de refração a 40°C, empregando-se um refratômetro de Abbé, de acordo com a metodologia descrita nas normas acima referidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos EPA e DHA e os valores dos índices de iodo e refração das amostras dos suplementos alimentares à base de óleo de sardinha estudados, bem como a média e o desvio-padrão.

Os resultados obtidos revelaram que apenas uma amostra (VH-1), dentre as 19 analisadas, mostrou porcentagens dos ácidos EPA e DHA bem abaixo dos valores declarados na fórmula apresentada para fins de registro. O respectivo índice de iodo foi o mais baixo de todos, correlacionando-se, portanto com os baixos teores dos dois ácidos; entretanto, o índice de refração da referida amostra foi similar aos das demais. Esta amostra não foi considerada no cálculo da média e desvio-padrão dos suplementos alimentares porque apresentou valores discrepantes dentro do conjunto de dados reunidos na tabela 1.

Quanto à demais amostras, a LP-3, adquirida no comércio, foi a única a apresentar a somatória dos ácidos EPA e DHA exatamente igual à relatada para os suplementos comumente disponíveis no mercado mundial, ou seja, 30%¹⁷. Por seu turno, outras amostras apresentaram quase todos os itens analisados fora das respectivas médias e desvios-padrão mas, mesmo assim, foram aceitas como aprovadas, pois o afastamento talvez se deva a algum dos fatores que costumam afetar a composição dos óleos de peixe, tornando-a tão diversificada^{14,27,28}, e não necessariamente a uma fraude. Aliás, no único trabalho publicado dentro da literatura consultada², abordando os conteúdos de EPA e de DHA em suplementos alimentares à base de óleos de peixe, realizado no Canadá, os autores consideraram como puras, amostras que exibiram desvios até maiores do que os aqui encontrados, atribuindo-os à susceptibilidade desses produtos à oxidação, tendo como consequência a presença de polímeros durante o seu fabrico e a diminuição dos teores daqueles dois ácidos.

Contrariando a teoria¹⁰, os suplementos ora analisados mostraram quantidades do ácido EPA superiores às de DHA. Dado o sigilo demonstrado pelos importadores quanto ao modo de preparo desses produtos, ficou difícil deduzir se foi empregado algum processo com o intuito de concentrar o primeiro ácido, por ser ele metabolizado diretamente pelo organismo¹⁷, ou se seria uma característica dos óleos de sardinha da Inglaterra. A primeira hipótese pode ser viável dado o avanço nas técnicas de criação dos peixes, onde é possível modificar a composição da sua gordura, visando o aumento das quantidades do ácido eicosapentaenóico¹⁴.

A tabela 2 apresenta a composição em ácidos EPA e DHA e valores dos índices de iodo e de re-

BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. de; TAVARES, M. & AUED-PIMENTEL, S. — Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2):75-81, 1991.

TABELA 1

Composição em ácidos graxos eicosapentaenóico e docosahexaenóico (%) e índices de iodo e de refração de suplementos alimentares à base de óleo de sardinha.

AMOSTRAS	ÁCIDOS GRAXOS (%)			ÍNDICES	
	EPA*	DHA**	EPA + DHA	Iodo (Wijs)	Refração a 40°C
VH-1	7,1	6,7	13,8	154,7	1,4760
NM-1	17,0	11,8	28,8	176,6	1,4761
SC-1	18,4	10,2	28,6	178,9	1,4760
NT-1	16,4	10,8	27,2	188,6	1,4760
VF-1	19,1	11,6	30,7	183,5	1,4760
VF-2	18,4	10,6	29,0	183,5	1,4760
VF-3	16,9	9,3	26,2	186,0	1,4760
VF-4	18,3	9,2	27,5	186,7	1,4760
MX-1	17,6	11,2	28,8	174,3	1,4750
MX-2	16,7	11,0	27,7	184,7	1,4762
FT-1	18,8	11,1	29,9	185,9	1,4760
PP-1	15,4	9,5	24,9	182,2	1,4760
PP-2	16,8	10,4	27,2	177,8	1,4760
PP-3	17,2	11,2	28,4	177,8	1,4761
PP-4	19,1	10,8	29,9	177,2	1,4762
LP-1	18,8	10,9	29,7	183,5	1,4761
LP-2	18,2	11,2	29,4	179,0	1,4760
LP-3	19,0	11,0	30,0	179,7	1,4760
LP-4	18,2	9,2	27,4	178,4	1,4770
Média	17,8	10,6	28,4	181,4	1,4760
DP***	1,1	0,6	1,5	4,1	0,0004

* EPA = ácido eicosapentaenóico

** DHA = ácido docosahexaenóico

*** DP = desvio-padrão.

TABELA 2

Composição em ácidos graxos eicosapentaenóico e docosahexaenóico (%) e índices de iodo e de refração de óleos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira.

AMOSTRAS N°	ÁCIDOS GRAXOS (%)			ÍNDICES	
	EPA*	DHA**	EPA + DHA	Iodo (Wijs)	Refração a 40°C
1	7,7	27,3	35,0	167,8	1,4755
2	6,8	8,6	15,4	166,4	1,4760
3	9,2	13,0	22,2	168,3	1,4736
4	14,5	10,9	25,4	170,8	1,4740
5	7,7	19,7	27,4	164,6	1,4734
6	9,2	15,6	24,8	176,5	1,4747
7	11,1	16,1	27,2	177,2	1,4749
8	13,2	13,0	26,2	170,2	1,4720
Média	9,9	15,5	25,2	170,2	1,4743
DP***	2,8	5,8	5,5	4,5	0,0013

* EPA = ácido eicosapentaenóico

** DHA = ácido docosahexaenóico

*** DP = desvio-padrão

fração relativos aos óleos de sardinha brasileira, extraído em laboratório, e suas respectivas médias e desvios-padrão.

Pode-se notar que todas as amostras apresentaram pelo menos um ítem, entre os analisados, fora da média e desvio-padrão. Embora a espécie de sardinha empregada tenha sido a mesma, ou seja, *Sardinella brasiliensis*, a grande variação na composição em ácidos graxos se revelou mais uma vez, neste caso em óleo de sardinha, face às diferentes épocas do ano e localização geográfica quando da captura.

Cabe ressaltar que, embora apenas a amostra 1 tenha apresentado a soma dos teores de EPA e DHA acima dos convencionais 30% (300mg/g), 6 entre 8 amostras exibiram quantidades de DHA superiores à fórmula-padrão declarada para os suplementos alimentares importados, no presente trabalho. No caso da amostra 1, o conteúdo de DHA foi superior até ao valor máximo de 20% constante na literatura¹⁰. Já os teores de EPA foram inferiores, em todos os casos, aos padronizados 18% (180mg/g).

Os valores dos índices de iodo e de refração, por seu turno, estiveram coerentes com os percentuais de EPA e de DHA encontrados, à exceção do índice de refração da amostra 2.

Excetuando-se a amostra 1, as quantidades dos ácidos EPA e DHA encontrados para os óleos de sardinha brasileira foram inferiores, na somatória, aos dos suplementos alimentares à base de óleo de sardinha da Inglaterra. Isso vem confirmar a teoria de que os óleos de peixe de águas mais frias são mais ricos em ácidos graxos polinsaturados do que os de regiões tropicais³¹. No que se relaciona às quantidades referidas na literatura¹⁰, isto é, EPA (8 a 12%) e DHA (10 a 20%), a maioria das amostras de óleo de sardinha analisadas se enquadra nessas faixas, principalmente no caso do ácido docosahexaenóico.

A figura 1 apresenta, como ilustração, um cromatograma característico de óleo de sardinha, diga-se de passagem correspondente a uma das amostras analisadas, com destaque para os ácidos EPA e DHA, lá representados pelos seus símbolos numéricos, 20:5 e 22:6, respectivamente. Não foram destacados os picos dos demais ácidos por não estarem incluídos no objetivo deste trabalho.

Quanto à metodologia analítica empregada, deve ser ressaltada que a cromatografia em fase gasosa revelou-se uma técnica adequada na detecção dos ácidos graxos ômega-3, EPA e DHA, considerado um desafio em análise de alimentos²¹. Essa constatação já havia sido feita no caso de óleo de fígado de bacalhau, que contém ambos os ácidos, principalmente DHA⁵.

No presente trabalho, o uso de coluna capilar deve ser destacado devido à boa resolução na identificação dos componentes tanto dos suplementos alimentares como dos óleos extraídos em laboratório, como pode ser observado na figura 1. Já o método qualitativo utilizado para extrair o óleo das sardinhas, adaptado de STANSBY & LEMON (quantitativo)²⁹, também foi adequado, dada a simplicidade e rapidez apresentadas.

Finalmente, um detalhe importante a ser enfatizado é que os teores de EPA e de DHA encontrados referem-se aos percentuais de cada ácido sobre o total de ácidos graxos e não em relação ao conteúdo por grama de suplemento alimentar. Como os ácidos graxos chegam a representar até 96% da composição do óleo⁹, a margem de erro dos resultados, obtida pelo método de normalização de área, pode ser considerada pequena, quando os mesmos forem confrontados com a fórmula-padrão dos suplementos, visto que esta é declarada por cada grama do produto.

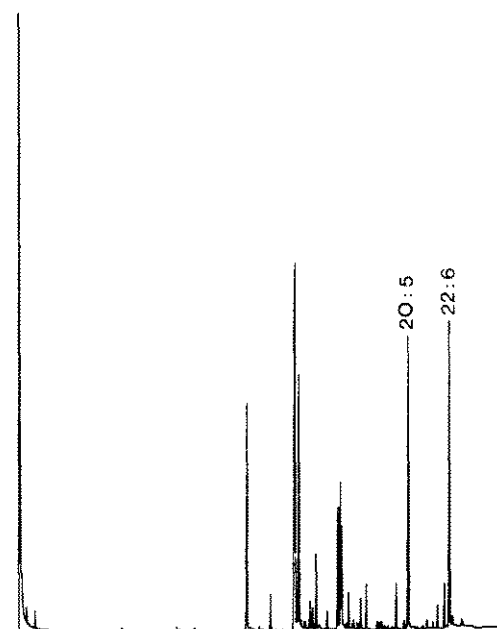


FIGURA 1
Cromatograma de ácidos graxos de óleo de sardinha.
(EPA = 20:5; DHA = 22:6)

CONCLUSÕES

Apenas uma entre dezenove amostras de suplementos alimentares à base de óleo de sardinha apresentou teores dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico bem afastados da média e desvio-padrão obtidos para o conjunto, em relação à fórmula declarada pelos importadores.

Ao contrário dos suplementos alimentares, seis entre oito amostras de óleo de sardinha brasileira

apresentaram baixos teores dos ácidos EPA, porém valores de DHA acima daquele convencionalmente adotado para os suplementos e, num caso, superior até ao limite máximo referido na literatura, podendo ser usados como matéria-prima de boa qualidade para a elaboração daquele produto.

Os suplementos alimentares, elaborados com óleo de sardinha da Inglaterra, apresentaram a somatória dos ácidos EPA e DHA superior à encontrada para os óleos de sardinhas brasileiras, confirmando assim, a teoria de que os peixes de águas mais frias são mais ricos em ácidos graxos polinsaturados do que os de águas tropicais.

Os valores dos índices de iodo obtidos se correlacionaram com o grau de insaturação dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, não ocorrendo o mesmo com os índices de refração, provavelmente devido à grande variação na composição em ácidos graxos apresentada pelos óleos de peixe.

A cromatografia em fase gasosa, revelou-se um método adequado para identificar e quantificar os ácidos EPA e DHA dos suplementos alimentares e dos óleos de sardinha extraídos em laboratório, especialmente pelo fato de se ter usada uma coluna capilar. O método qualitativo adaptado para extrair o óleo das sardinhas também foi adequado.

Deve ser exigido dos importadores e dos fabricantes dos suplementos um melhor esclarecimento, por ocasião do registro do produto, quanto ao processo de fabricação, a fim de que os analistas possam melhor interpretar os resultados encontrados.

A verificação da composição dos suplementos alimentares é importante, visto que estando em desacordo com a fórmula, o produto não só lesa o consumidor como pode trazer prejuízos à sua saúde, particularmente no caso de certas doenças cardiovasculares.

Até que os mecanismos dos efeitos colaterais dos suplementos alimentares à base de óleos de peixe sejam melhor estudados, seria recomendável um controle mais rígido no comércio e na ingestão de cápsulas desses produtos, bem como o incentivo ao consumo regular de peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Nutricionista Sandra Maria Chemin Seabra da Silva, pós-graduanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo fornecimento de amostras para a execução da parte experimental.

RIALA6/713

BODOLATO E.S.G.; CARVALHO, J.B. de; TAVARES M. & AUED-PIMENTEL, S. — Determination of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids in Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) oil and in encapsulated sardine oil supplements. Rev Adolfo Lutz, 51 (1/2):75-81, 1991.

ABSTRACT: Fish oils are the most important natural reservoir of polyunsaturated fatty acids, like omega-3 eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA), to whom are attributed benefits in prevention and treatment of certain cardiovascular diseases. The increasing of the offer of encapsulated fish oil supplements led us to verify their quality. For this purpose, 19 samples of sardine oil supplements, imported from England and encapsulated in Brazil, and 8 samples of Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) oil, extracted in laboratory, were analysed for their contents of EPA and DHA acids, in total amounts of fatty acids, by gas chromatography on a CARBOWAX 20 M fused silica capillary column. In all the samples were also determined the iodine value (Wijs) and the refraction index at 40°C. The results showed that only one of the samples of sardine oil supplements was very much in disaccord with declared pattern-formula and its iodine value was very low too. In the other hand, the sardine oils analysed showed low amounts of the EPA acid and low iodine value and refraction index; 6 among 8 of the samples analysed showed levels of DHA upper than the required for the supplements (120 mg(g)), compensating the low values of EPA found. Then the Brazilian sardine oil investigated may be considered of good quality for use as raw material for the manufacture of those supplements.

DESCRIPTORS: sardine oil, determination of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in; sardine oil, iodine value and refraction index; alimentary supplements, determination of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in; alimentary supplements, iodine value and refraction index; gas chromatography.

BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. de; TAVARES, M. & AUED-PIMENTEL, S. — Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2):75-81, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKMAN, R.G. & McLEOD, C. — Total lipids and nutritionally important fatty acids of some Nova Scotia fish and shellfish products. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 21(4): 390-8, 1988.
2. ACKMAN, R.G.; RATNAYAKE, W.M.N. & MACPHERSON, E.J. — EPA and DHA contents of encapsulated fish oil products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66(8): 1162-4, 1989.
3. ANDRADE, M.O. de — Fish overview in Brazil. *Bol. SBCTA*, 23(3/4): 169-78, 1989.
4. ANTUNES, S.A. — A tecnologia do pescado na Região Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 5º, Fortaleza, 1987. *Anais*. p. 484.
5. BADOLATO, E.S.G.; MAIO, F.D.; LAMARDO, L.C.A. & ZENEON, O. — Óleos naturais: verificação de sua qualidade por cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 87-95, 1987.
6. BIMBO, A.P. — The emerging marine oil industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(5): 706-15, 1987.
7. DYEBERG, J. Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.*, 44(4): 125-34, 1986.
8. HARRIS, W.S. — Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.*, 30: 785-804, 1989.
9. HARTMAN, L. & ESTEVES, W. — *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, s.d. 169 p. (Série Tecnologia Agroindustrial, 13).
10. HEARN, T.L.; SGOUTAS, S.A.; HEARN, J.A. & SGOUTAS, D.S. — Polyunsaturated fatty acids and fat in fish flesh for selecting species for health benefits. *J. Food Sci.*, 52(5): 1209-11, 1987.
11. HEROLD, P.M. & KINSELLA, J.E. — Fish oil consumption and decreases risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 566-98, 1986.
12. HOLUB, B. Health effects of fish oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(11): 1722-6, 1988.
13. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (São Paulo). — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. p. 245-66.
14. KAYAMA, M. — Fish farming and aquaculture. Can we modify fish fat with more EPA? *J. Fac. appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ.*, 25(1/2):19-28, 1986.
15. KINSELLA, J.E. — Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Technol.*, 40(2): 89-97, 1986.
16. LABOMAR — MUN. Cida Program. — *Ciência e tecnologia de produtos pesqueiros*. St. John's, Newfoundland, MUN Printing Services, 1989. V.1A: Ciência e tecnologia de organismos aquáticos. p. 1162.
17. LEAF, A. & WEBER, P. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N. Engl. J. Med.*, 318(9): 549-57, 1988.
18. MURPHY, M.G. — Dietary fatty acids and membrane protein function. *J. Nutr. Biochem.*, 1(2): 68-79, 1990.
19. NESTEL, P.J. — Fish oil fatty acids: the answer to heart disease? *CSIRO Food Res. Q.*, 47: 9-12, 1987.
20. PIGOTT, G.M. & TUCKER, B.W. — Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. *Food Rev. Int.*, 3(1/2): 105-38, 1987.
21. POURCHET-CAMPOS, M.A. — Os lipídios na alimentação: uma benção e um desafio. (Apresentado ao V Encontro Nacional de Analistas de Alimentos — ENAAL) Salvador, BA, 1989.
22. PRODUCTION exceeds 52 million MT. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(8): 1232-6, 1988.
23. RIBEIRO, L.G.T. — Óleo de peixe. *O Estado de S. Paulo*, 29 julho 1990. p. 52.
24. SILVA, S.M.C.S & MANCINI FILHO, J. — Influência de diferentes formas de processamento sobre os teores de ácidos graxos polinsaturados em algumas espécies de pescado brasileiro. In: SEMINÁRIO DA PÓS-GRADUAÇÃO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA USP, 5º, São Paulo, 1990. *Programa e Resumos*. p. 9.
25. STANSBY, M.E. — Nutritional properties of fish oils. *World Rev. Nutr. Diet.*, 11:46-105, 1969.
26. STANSBY, M.E. — Polyunsaturates and fat in fish flesh. *J. Am. Diet. Ass.*, 63:625-30, 1973.
27. STANSBY, M.E. — Reliability of fatty acids values purporting to represent composition of oil from different species of fish. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58(1): 13-6, 1981.
28. STANSBY, M.E. — Properties of fish oils and their application to handling of fish and to nutritional and industrial use. In: Martin, R. ed. *et. al. — Chemistry and biochemistry of marine food products*. Westport, AVI, 1982. cap. 7, p. 75-91.
29. STANSBY, M.E. & LEMON, J.M. — Quantitative determination of oil in fish flesh. *Ind. Eng. Chem.*, 9(7): 341-3, 1937.
30. TSUCHIYA, T. — Biochemistry of fish oils. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as food*. New York, Academic Press, 1961. v.1, cap. 7, p. 211-58.
31. WANG, Y.J.; MILLER, L.A.; PERREN, M & ADIS, P.B. — Omega-3 fatty acids in Lake Superior fish. *J. Food Sci.*, 55(1): 71-3, 76, 1990.

Recebido para publicação em 18 de fevereiro de 1991.

PADRONIZAÇÃO DO PREPARO DE LISADOS HEMOGLOBÍNICOS ESTÁVEIS PARA USO EM LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA.*

Elena Y. GUSHIKEN**
Marcos A. Gonçalves MUNHOZ**
Cecília KITAMURA**
Vânia M. C. ZAMFIROV**
Luiz I. NIERO**

RIALA6/714

GUSHIKEN E. Y.; MUNHOZ, M. A. G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V. M. C.; NIERO, L. I.; Padronização do preparo de lisados hemoglobínicos estáveis para uso em laboratório de saúde pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):83-86, 1991.

RESUMO: Foram selecionadas amostras de sangue humano, com sorologia negativa para HIV e hepatite B, para se avaliar as condições de preparo e estabilidade de lisados hemoglobínicos, no monitoramento da quantificação da hemoglobina. A metodologia empregada foi um sistema de congelamento e descongelamento que originou um padrão de hemoglobina estável por 6 meses e de baixo custo operacional, que poderá ser utilizado no controle de qualidade intra e interlaboratorial do deseamento de hemoglobina.

DESCRIPTORIOS: controle de qualidade, padrão de hemoglobina.

INTRODUÇÃO

Diante das dificuldades de conservação das amostras controles (recém-colhidas), devido principalmente ao problema de transporte que provoca exposição à variação de temperatura, o PIEEC, "Plan Internacional de la OMS de Evaluacion Externa de Calidad" sugere preparar lisados estéreis para a hemoglobina e sangue estabilizado para as contagens celulares, por fixação com formaldeído ou glutaraldeído^{2,4,7}.

Para obtenção de controles de forma simples e eficaz a World Health Organization sugere misturas de várias amostras de sangue, selecionadas pela dosagem de hemoglobina com valores superiores a 13,0 g/dL

O objetivo do presente trabalho é a padronização do preparo de lisados hemoglobínicos a partir de um "pool" de sangue humano composto por amostras encaminhadas pelas unidades básicas de saúde, selecionadas pela dosagem de hemoglobina segundo WHO^{5,6,9}, e sua utilização em labora-

tório de Saúde Pública, no controle de qualidade interno e externo.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparamos dois lotes de padrões de hemoglobina com concentração (8,0 g/dL IAL e 15,0 g/dL IAL) e utilizamos um terceiro adquirido externamente (13,7 g/dL Celm).

O "pool" de sangue humano foi selecionado de mistura de cinco amostras (5 mL cada), colhidas com EDTA separando-se o plasma por centrifugação (1500g), com testes negativos para HIV e Hepatite B³ processados em capela de fluxo laminar, filtrados a vácuo e aliquoteados em frascos estéreis e conservados a 4°C

Hemolisados. O preparo do hemolisado seguiu as seguintes etapas:

- 1) Centrifugou-se o sangue em frasco esterilizado de tamanho adequado, a 1500g e por 20 minutos.
- 2) Adicionou-se o ao sedimento de células ver-

* Realizado na Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz

** Do Instituto Adolfo Lutz.

melhas, igual volume de solução fisiológica estéril, misturando-se por inversão, centrifugando-se, descartando-se o sobrenadante e a camada superficial.

3) Repetiu-se a lavagem por três vezes consecutivas, para assegurar a completa remoção do plasma, leucócitos e plaquetas.

4) Os glóbulos vermelhos foram lisados por congelamento (-20°C) e descongelamento para obter-se hemólise total.

5) Adicionou-se igual volume de clorofórmio ao hemolisado, agitando-se vigorosamente com auxílio de um vibrador mecânico e refrigerou-se "overnight" para permitir a separação do estroma.

6) Após 24 horas, centrifugou-se a 1500g por 20 minutos, descartando-se a camada lipídica extraída.

7) Filtrou-se em papel de filtro Whatmann nº 42 adaptado em um funil de Buchner ligado a tampa de sucção.

8) Para cada 70 ml do lisado, adicionou-se 30 ml de glicerol puro e para cada 500 ml do glicerol-lisado, adicionou-se uma dose de penicilina-estreptomicina (1000 UI/5000 UI)³. Para obter-se uma concentração mais baixa, adicionou-se 30% (v/v) de glicerol em 9g/L de solução fisiológica ao concentrado lisado. Estocou-se a 4°C.

9) O material preparado foi distribuído em frascos esterelizados tipo penicilina. O produto mantém-se estável por dois anos quando conservados fechados e lacrados segundo o ICSH. Os dosamentos sequenciais foram realizados em hemoglobímetro semi automatizado da Celm, CC 110 e Hb 520, e a concentração de Hb da amostra foi

determinada em espectrofotômetro digital Microanal B 34211, aplicando-se a fórmula indicada pelo ICSH^{6,10}. Foram realizados paralelamente aos dosamentos semanais, controles de contaminação por microorganismos (bactérias e fungos) durante 6 meses.

O tratamento estatístico foi efetuado correlacionando-se os resultados obtidos com os padrões IAL 8,0 g/dL e 15,0 g/dL e Celm 13,7 g/dL.

Método de Determinação da Concentração Hemoglobínica^{1,2,8,9}.

$$\text{Conc. de Hb (g/dL)} = \frac{A(540) \times 64500 \times 201}{44 \times d \times 1000 \times 10}$$

onde:

- A (540) = absorvância da solução de cianometahemoglobina (HiCN) em 540 nm
- 201 = fator de diluição (20 uL / 4 mL)
- 44 = coeficiente de extinção milimolar (11)
- d = espessura da cubeta em cm (d = 1 cm)
- 1000 = fator de conversão de mg para g
- 10 = fator de conversão de g/L para g/dL
- 64500 = peso molecular de Hb (aproximado a partir do dado base de 64458)³.

As determinações de hemoglobina foram efetuadas em 3 grupos de 82 amostras cada. A concentração hemoglobínica dos lisados foram comparados com padrão 13,7 g/dL Celm.

RESULTADOS

Os resultados estatísticos obtidos estão apresentados de forma resumida na Tabela 1

TABELA 1

	CONCENTRAÇÕES DE PADRÕES DE Hb (g/dL)		
	8,0 IAL	15,0 IAL	13,7 CELM
Nº determinações	82	82	82
Média ± d. p.	7,961 ± 0,103	15,010 ± 0,127	13,656 ± 0,129

Quando comparados entre si (p<0,05) encontramos os seguintes resultados: o coeficiente de correlação entre os padrões IAL 8 e 15 g/dL foi de 0,9835 para um r crítico de 0,22, o que nos mostra a significância destes resultados. Entre os padrões IAL 8 g/dL e Celm 13,7 g/dL o r = 0,9918, entre os padrões IAL 15 g/dL e Celm 13,7 g/dL o r = 0,9896, portanto com significância similar à comparação anterior.

Apresentamos na figura 1 as retas de regressão linear obtidas comparando-se as determinações dos padrões 8 IAL, 15 IAL e 13,7 Celm. Os coeficientes angulares foram: 0,5237 para a reta A e 0,5808 para a reta B o que equivale a dizer que o compor-

tamento dos padrões foi semelhante.

A metodologia empregada segue as normas do Comitê Internacional de Hematologia, porém adaptada a nossa realidade.

Nossa contribuição foi a introdução de um sistema de congelamento e descongelamento de amostras que facilita o manuseio, garantindo maior quantidade de lisados hemoglobínicos em comparação ao método preconizado pelo ICSH.

Os testes realizados em nosso laboratório, utilizando dosagens semanais, mostraram boa reprodutibilidade e conservação, semelhantes ao padrão comercial nacional (Celm-globin) (Tabela 1). Não observamos nenhuma contaminação do material durante

o período de 6 meses nos frascos em uso, entretanto, não foi objetivo deste trabalho controlar a contaminação de frascos lacrados por 2 anos.

CONCLUSÕES

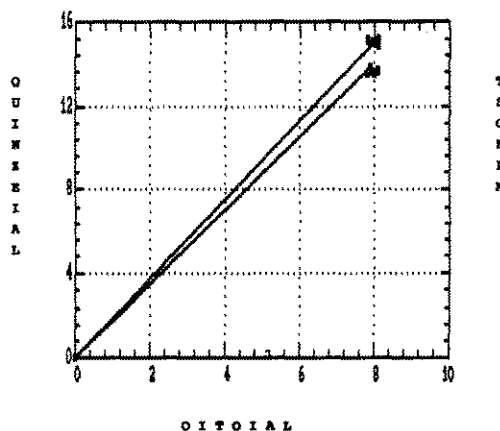
— A preparação preconizada pelo ICSH modificada em nossos laboratórios tem um comportamento comparável aos produtos comercializados acrescentando as vantagens:

a) menor custo operacional e independência de fontes fornecedoras externas.

b) A obtenção de um material estável poderá viabilizar um intercâmbio entre os laboratórios que compõem a rede SUDS-SP e outros, permitindo a implantação de um sistema de controle de qualidade intra e extralaboratorial.

c) Pode ser usado para monitoramento das reações de quantificação das hemoglobinas devido a sua simplicidade e grande reprodutibilidade.

FIGURA 1
Comparação entre as curvas obtidas com os padrões hemoglobínicos



Reta A: Comparação entre padrões 8,0 g/dL IAL e 13,7g/dL Celm.

Reta B: Comparação entre padrões 15,0 g/dL IAL e 13,7g/dL Celm.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Heidi Pinto Martins, da Seção de Análises Clínicas Auxiliares, e as Seções de Sorologia, Virologia e Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, central, pela colaboração neste trabalho.

RIALA6/714

GUSHIKEN E. Y.; MUNHOZ, M. A. G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V. M. C.; NIERO, L. I.; Standardization of the stable lysates prepare for the use at the public health laboratory. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):83-86, 1991.

ABSTRACT: Hepatitis B and HIV negative human blood samples were selected in order to evaluate the conditions of stable lysates in the monitoring of hemoglobin quantification. For this purpose, we employed a freezing-defrosting system which generated an inexpensive hemoglobin standard, stable for 6 months. This methodology could be successfully used in the quality control of all laboratories involved with hemoglobin quantification.

DESCRIPTORs: quality control, hemoglobin standard.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, J.D. — *Clinical laboratory methods*. 9th. ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1982. p. 46-7.
2. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. — *Practical haematology*. 5th. ed. London, Churchill Livingstone, 1975. p. 31-7, 60.
3. LEHNINGER, A.L. — *Princípios de bioquímica*. 5ª ed. São Paulo, Sarvier, 1989. p. 136.
4. LEWIS, S.M. — El plan internacional de la OMS de evaluación externa de la calidad en hematología. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 106 (5): 407-19, 1989.

GUSHIKEN E. Y.; MUNHOZ, M. A. G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V. M. C.; NIERO, L. I.; Padronização do preparo de lisados hemoglobínicos estáveis para uso em laboratório de saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):83-86, 1991.

5. LEWIS, S.M. — *The principles and methods of quality assurance in haematology*. Geneva, WHO, 1984. (WHO/LAB/84.3).
6. LEWIS, S.M. — *Quality assurance in haematology: a training course manual practical work-book*. Geneva, WHO, 1984. (WHO/LAB/84.6).
7. LEWIS, S.M. & BURGUESS, B.J. — Quality control in haematology: report of interlaboratory trials in Britain. *Brit. med. J.* 4: 253-6, 1969.
8. SABRAFEN, J.S. — *Hematologia clínica*. 3ª ed. Barcelona, 1982. p. 5, 27-9, 189-90.
9. VAN ASSENDELFT, O.W.; HOLTZ, A.H. & LEWIS, S.M. — *Recommended method for the determination of the haemoglobin concentration of blood*. Geneva, WHO, 1984. (WHO/LAB/84.10).
10. VAN KAMPEN, E.J. & ZIJLSTRA, W.G. — Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clin. chim. Acta.* 6: 538-44, 1961.
11. ZIJLSTRA, W.G. & VAN KAMPEN, E.J. — Standardization of hemoglobinometry I. The extinction coefficient of hemiglobincyanide. *Clin. chim. Acta.* 5: 719-26, 1960.

Recebido para publicação em 15 de março de 1991.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE ISOLADOS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO — FREQUÊNCIA DOS BIOTIPOS E SOROTIPOS*

Iika Maria LANDGRAF**
Maria de Fátima Paiva VIEIRA**

RIALA6/715

LANDGRAF, L.M. & VIEIRA, M.F.P. — *Haemophilus influenzae* isolados de líquido cefalorraquidiano — Frequência dos biotipos e sorotipos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2):87-91, 1991.

RESUMO: *Haemophilus influenzae* causam várias doenças invasivas, das quais a meningite é a mais freqüente, e se constituem em uma grande ameaça à saúde em todo o mundo. Nos exames laboratoriais do líquido cefalorraquidiano (LCR) realizados na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Referência Nacional para meningites, São Paulo, SP, esta bactéria tem figurado como um dos agentes etiológicos predominantes das meningites. Foram estudadas 1.000 cepas de *H. influenzae* isoladas de LCR no período de 1977 a 1990. A caracterização da espécie *H. influenzae* e a definição dos biotipos foram obtidas através do estudo de propriedades bioquímicas, e também foram determinados os sorotipos através de reações de aglutinação com antíseros específicos. Dentre os biotipos, o mais freqüente foi o I (70,9%), seguido do II (27,5%). Com relação aos sorotipos o *b* foi o mais prevalente (99,3%), mas sorotipos *a* (0,6%) e *c* (0,1%) também foram encontrados.

DESCRITORES: *Haemophilus influenzae*; *H. influenzae*, biotipos e sorotipos; meningites por *H. influenzae*.

INTRODUÇÃO

Membros do gênero *Haemophilus* são parasitas obrigatórios integrantes da microbiota normal do trato respiratório, mais propriamente do orofaringe, do homem e de alguns animais. A espécie *H. influenzae* é responsável por uma variedade de doenças em humanos, que variam de uma simples faringite a doenças graves como a meningite.

Morfologicamente, *H. influenzae* são bacilos Gram negativos que podem se apresentar como co-co-bacilos e formas filamentosas caracterizando pleomorfismo. As colônias em agar chocolate são lisas, baixas, convexas, acinzentadas, translúcidas e atingem de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro. Não apresentam hemólise em ágar-sangue. Cepas isoladas de infecções invasivas são geralmente encapsuladas.

O crescimento destes bacilos em meio de cultu-

ra é caracterizado pela sua dependência do chamado fator V. Este fator está proximamente ligado ao processo de oxidação-redução do crescimento celular, sendo uma das duas co-dehidrogenases, NAD ou NADP, ou certos precursores indefinidos das mesmas. São também desprovidos da capacidade enzimática de converter o ácido delta-aminolevulínico à porfirina, exigindo, portanto hemina do sangue ou fator X.

A diferenciação das espécies de *Haemophilus*, no entanto, requer outras provas além da dependência dos fatores V e X. As reações de degradação de carboidratos e outras reações bioquímicas são dados importantes para a caracterização de espécie e de biotipos, como também é importante a determinação dos sorotipos através da pesquisa dos antígenos capsulares.

Considerando-se a importância da *H. influenzae* que entre nós tem sido agente freqüente de me-

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

ningites, foi estudada a caracterização dos biotipos e sorotipos de cepas isoladas de líquido cefalorraquidiano, na região de São Paulo, SP, Brasil, no período de 1977 a 1990.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *Haemophilus* sp, em um total de 1.000, foram isoladas de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) no laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Referência Nacional para meningites, São Paulo, SP. Recomendou-se a semeadura direta logo após a punção, de pelo menos 5 gotas do LCR em ágar chocolate a 5% (sangue de coelho), tendo como meio base o ágar Mueller Hinton. O meio de cultura semeado foi incubado o mais rápido possível a 35-37°C em ambiente de 5-10% de CO₂ e umidade¹. Havendo crescimento, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram modificado por Hucker⁵. A presença de bacilos Gram negativos, predominantemente de coco-bacilos, e com características de pleomorfismo, de culturas com colônias pequenas, translúcidas, acinzentadas, orientou para a realização da prova de satelitismo em placa de ágar-sangue de carneiro a 5%, base ágar comum¹², na qual também foi observada a presença ou ausência de hemólise. O inóculo para esta prova correspondeu a uma diluição a 1:100 de uma suspensão com turbidês equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Para o estudo das características bioquímicas e sorológicas foram realizadas subculturas em meio ágar chocolate a 10% (sangue de cavalo) base BHI (Brain Heart Infusion). A caracterização do gênero *Haemophilus* e espécie *influenzae* foi desenvolvida segundo metodologia atualizada empregada no Laboratório do Prof. Kilian, em Aarhus, Dinamarca (comunicação pessoal). Assim, foram realizadas provas de catalase e oxidase^{11,13,24} e determinada a habilidade ou não da biosíntese de porfirinas a partir do ácido delta-aminolevulínico (ALA) através do teste da Porfirina^{10,13,14}. A degradação de carboidratos foi observada em base PRB (Phenol Red Broth), Difco, esterilizada por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, à qual foram acrescentados os açúcares glicose, sacarose, lactose, xilose e manitol, esterilizados por filtração, na concentração final de 1%. A produção ou não de gás resultante da fermentação da glicose foi observada com o auxílio do tubo de Durham colocado no tubo contendo este carboidrato^{11,14}. A estas bases foram acrescidos os fatores V e X produzidos no laboratório: o V a partir de levedo de pão e o X a partir de sangue coagulado, ambos na concentração final de 1%¹⁶. Comparativamente, na observação da fermentação

da sacarose, foi empregado NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) comercial Difco ou Sigma (fator V) em uma concentração final de 10ug/ml^{11,12,13,14}. As reações de fermentação, quando negativas em 24 h de incubação, foram observadas até cerca de 5 dias. A produção ou não de Beta-galactosidase — ONPG — foi desenvolvida segundo Bülow³, como descrita por Lee e colaboradores¹⁵. As provas de determinação das enzimas triptofanase, urease e ornitina descarboxilase foram realizadas segundo Kilian^{6,9,11,12,13,14,22,24}. Nos substratos para ornitina¹⁸, uréia e indol¹⁷, em quantidades de 0,5 ml em tubos de 12X120, foi emulsionada uma alça bem cheia do inóculo bacteriano de 24 a 48 h e a leitura realizada após incubação a 37°C por 4 a 24 h. Para a revelação de indol foi empregado o reativo de Kovacs^{12,13,14}. A identificação dos sorotipos, designados de *a* até *f*^{2,4,12,13,14,19,21} foi processada por soroaglutinação em lâmina, empregando-se antissoros Difco e os produzidos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, segundo a metodologia do CDC⁷.

RESULTADOS

As cepas de *Haemophilus* estudadas se caracterizaram, por apresentarem uma morfologia de bacilos Gram negativos, curtos, porém ligeiramente pleomórficos. As colônias em ágar chocolate a 5%, base Mueller-Hinton, eram lisas, baixas, convexas, acinzentadas, translúcidas e pequenas. Não eram hemolíticas em ágar-sangue. Apresentaram prova de satelitismo positiva e prova do ALA negativa e não se desenvolveram em ágar comum. Todas as cepas foram catalase e oxidase positivas, embora em algumas a reação de oxidase tenha sido relativamente tardia. Definindo a espécie *H. influenzae*, houve fermentação dos carboidratos glicose, sem produção de gás, e xilose, com poucas exceções desta última. Confirmando a espécie, não houve fermentação da sacarose com o emprego do NAD comercial, no entanto, com o emprego do fator V produzido a partir de levedo de pão, ocorreram reações positivas falsas.⁸ Foram negativas também as reações de fermentação da lactose e de manitol (Quadro 1). A pesquisa das enzimas triptofanase (indol), urease e ornitina descarboxilase, que definem a subdivisão em biotipos, revelou que o biotipo I foi o mais prevalente nos 14 anos considerados (Tabela I) com a média total de 70,9%. Os sorotipos, determinados pelo polissacarídeo capsular, foram predominantemente o sorotipo *b* (99,3%), dos quais 99,4% pertenceram ao biotipo I, com a ocorrência também dos sorotipos *a* (0,6%) e *c* (0,1%). Algumas cepas não foram sorotipadas por ausência da cápsula (Tabela II).

QUADRO 1

Características enzimáticas dos Haemophilus influenzae estudados. IAL. São Paulo. SP

Dependência de NAD (satelitismo)	+	100%
Síntese de porfirinas a partir do ácido delta-aminolevulínico (ALA)	—	100%
Hemólise	—	100%
Catalase	+	100%
Oxidase	+	100%
ONPG (Beta-galactosidase)	—	100%
Ácido de glicose	+	100%
Gás de glicose	—	100%
Ácido de sacarose	—	100%
Ácido de lactose	—	100%
Ácido de xilose	+	99,8%
Ácido de manitol	—	100%

TABELA I

Resultados numéricos e percentuais dos biotipos de H. influenzae isolados de LCR no período de 1977 a 1990. IAL. São Paulo. SP.

Ano	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	Total
Biotipo I	Nº 4	31	24	31	29	43	53	57	108	84	65	69	80	31	709
	% 100	88,6	70,6	67,4	69,1	58,9	63,1	77,0	76,1	77,1	66,4	71,8	68,4	67,4	70,9
Biotipo II	Nº	4	10	15	13	29	31	16	32	22	29	24	35	15	275
	%	11,4	29,4	32,6	30,9	39,7	36,9	21,6	22,5	20,2	29,6	25,0	29,9	32,6	27,5
outros (III,IV,V)	Nº					1		1	2	3	4	3	2		16
	%					1,4		1,4	1,4	2,7	4,0	3,2	1,7		1,6
TOTAL	nº	4	35	34	46	42	73	84	74	142	109	98	96	117	1000
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

TABELA II

Frequência dos sorotipos de H. influenzae estudados

ANO	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	Total	
Sorotipo a	Nº								2	1	2	1			6	
	%								1,4	0,9	2,1	1,1			0,6	
b	Nº	4	35	34	46	42	72	84	73	139	106	95	91	115	45	981
	%	100	100	100	100	100	98,6	100	100	98,6	99,1	97,9	98,9	100	100	99,3
c	Nº					1										1
	%					1,4										0,1
Total de cepas encapsuladas		4	35	34	46	42	73	84	73	141	107	97	92	115	45	988
NT	Nº							1	1	2	1	4	2	1		12
Total de cepas estudadas		4	35	34	46	42	73	84	74	142	109	98	96	117	46	1000

NT = não tipável

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Haemophilus influenzae causa várias doenças invasivas, das quais a meningite é uma das mais graves, e se constitui em uma grande ameaça à saúde, em todo o mundo. Nos Estados Unidos, Finlândia e Suécia, *H. influenzae* tipo *b* tem sido o agente causal mais freqüente das meningites bacterianas^{20,23}. Dentre as amostras de LCR dos casos suspeitos de meningite bacteriana processadas nesta Seção de Bacteriologia, *H. influenzae* tem aparecido como o agente prevalente. Exceção foi observada quando da epidemia por *Neisseria meningitidis*, sorogrupo C e A, de 1972 a 1978, e mais recentemente, a partir de 1987, com prevalência maior de *N. meningitidis* sorogrupo B.

O gênero *Haemophilus* se caracterizou por apresentar morfologia de bacilos Gram negativos, geralmente pleomórficos, e por produzir prova de satelitismo positiva, não se desenvolvendo em meios de cultura simples, como o ágar comum. A prova de satelitismo é, no entanto, presuntiva e quando não é tecnicamente bem realizada pode levar a falsas interpretações. Isso ocorre quando o inóculo é muito carregado e há crescimento em toda a área semeada. Nos casos duvidosos, a prova foi repetida com inóculo diluído. Observamos que o melhor resultado é obtido com um inóculo correspondente a uma diluição a 1:100 partindo de uma suspensão com turbidês equivalente a 0,5 da escala de McFarland, e aplicada sempre em ágar-sangue de carneiro¹².

A habilidade ou não de sintetizar porfirinas a partir do ácido delta-aminolevulínico (ALA) é um dado de grande importância. O emprego do ALA na determinação da dependência do fator X vem esclarecer a dúvida que surge quando o *Haemophilus influenzae* cresce em presença somente do fator V em meio base PRB. Demonstra-se assim a notória dificuldade de se produzir um meio de cultura livre de traços do fator X ou porção férrica do sangue, e também que, mesmo exercendo-se o preparo do inóculo com cuidados extremos, o fator X é freqüentemente carregado do ágar chocolate. Além da impureza dos meios de cultura, a condição parcial de anaerobiose que se forma em meio líquido como o PRB faz com que esta bactéria se torne menos exigente ou independente deste fator.

líquido como o PRB faz com que esta bactéria se torne menos exigente ou independente deste fator.

A importância de realizar provas bioquímicas para a caracterização das espécies do gênero *Haemophilus* foi salientada por Kilian¹¹, quando cita Hable, Logan & Washington (1971), que, trabalhando com líquido cefalorraquidiano, reportam o *H. parainfluenzae* como causa de meningite, porém seus resultados foram baseados somente na dependência dos fatores V e X. Estas provas são consideradas insuficientes para definir as espécies deste gênero.

A correlação entre biotipo e sorotipo foi discutida por Zinnemann²⁴ e Kilian¹⁴, tendo o primeiro relatado não haver associação, porém com base em um pequeno número de cepas dos biotipos III e IV não encapsuladas. O segundo refere-se a uma relação entre biotipo de *H. influenzae*, fonte de isolamento e sorotipo capsular.

Neste trabalho a maioria das cepas pertenceram ao biotipo I (70,9%) e ao sorotipo *b* (99,3%), concordando com diferentes autores^{14,22,23}. Das cepas do biotipo I, 99,4% apresentaram um antígeno capsular do sorotipo *b* (0,2% do sorotipo *a* e 0,4% não eram encapsuladas), verificação esta que parece indicar uma relação entre biotipos e sorotipos, conforme citado por Kilian¹⁴. Das cepas não tipáveis, 8 pertenceram aos biotipos II, III e IV (70%) e 4 ao biotipo I (30%) (Tabelas I e II). Estas cepas não encapsuladas foram isoladas, na sua maioria (58,3%) de amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes na faixa etária acima de 8 anos. Com relação à cepa do sorotipo *c*, foi isolada de LCR de um paciente com 17 anos de idade, e quanto às cepas do sorotipo *a*, estas foram isoladas de pacientes com idades que variaram de 2 meses a 12 anos. No entanto, nossos dados são insuficientes para relacionar os achados desses sorotipos menos freqüentes à idade do paciente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Augusto d'Escragnole Taunay pela inestimável orientação recebida na elaboração deste trabalho, e a Maria Cristina de Cunto Brandileone pelo fornecimento dos antissoros.

RIALA6/715

LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. — *Haemophilus influenzae* isolated from cerebrospinal fluid — Frequency of biotypes and serotypes, Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2),87-91, 1991.

ABSTRACT: *Haemophilus influenzae* are causal agents of human diseases, chiefly meningitis, all over the world. In the examinations of CSF in the laboratory of Bacteriology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, this bacterium was the one most frequently isolated, together with *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. For the characterization of *H. influenzae* species and biotypes definition, biochemical tests were performed, as well as serotyping of the capsulated strains. From 1977 to 1990, 1.000 strains of *H. influenzae* isolated from

CSF were studied. Among biotypes, the most frequent was I (70,9%) and the next one was II (27,5%). Concerning serotypes, *b* was the most prevalent (99,3%), but type *a* (0,6%) and *c* (0,1%) were also found.

DESCRIPTORS: *Haemophilus influenzae*; *H. influenzae*, biotypes and serotypes; *H. influenzae meningitis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE AÇÕES BÁSICAS DE SAÚDE. DIVISÃO NACIONAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA — Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1986. 49 p. (Série A: Normas e Manuais Técnicos, 32).
- BUCK, L.L. & DOUGLAS, G.W. — Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type *e*. *J. clin. Microbiol.* 4:381, 1976.
- BÜLOW, P. — The ONPG Test in diagnostic bacteriology. I. Methodological investigations. *Acta. path. microbiol. scand.* 60: 376-386, 1964.
- DRAYNA, C.J. — *Haemophilus influenzae* type *c* meningitis with sepsis. *JAMA*, 244:1476, 1980.
- FINEGOLD, S.M. & MARTIN, W.J. — *Diagnostic microbiology*, 6th ed. St. Louis, Mosby, 1982. p. 655-656.
- GRATTEN, M. — *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J. clin. Microbiol.* 18: 1015-1016, 1983.
- HARRELL, W.K.; ASHWORTH, H.; BRITT, L.E.; GEORGE, J.R.; GRAY Jr, S.B.; GREEN, J.H.; GROSS, H. & JOHNSON, J.E. — *Procedural manual of production of bacterial, fungal and parasitic reagents*. Atlanta, CDC, 1970. p. 18-20.
- HOLLIS, D.G.; SOTTNEK, F.O.; BROWN, W.J. & WEAVER, R.E. — Use of the rapid fermentation test in determining carbohydrate reactions of fastidious bacteria in clinical laboratories. *J. clin. Microbiol.*, 12: 620-623, 1980.
- KAMME, C. — Biotypes of capsulated and non-capsulated *Haemophilus influenzae*. Correlation between biotypes and β -lactamase production. *Acta. path. microbiol. scand.* Sect. B, 88:261-264, 1980.
- KILIAN, M. — A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. The porphyrin test. *Acta. path. microbiol. scand.*, Sect. B, 82:835-842, 1974.
- KILIAN, M. — A taxonomic study of the Genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. gen. Microbiol.*, 93:9-62, 1976.
- KILIAN, M. — The Genus *Haemophilus*, In: STARR, M.P.; SOLP, H.; TRÜPER, H.G.; HALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G., ed. — *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. New York. Springer-Verlag, 1981, vol. 2, p. 1371-1382.
- KILIAN, M. & BIBERSTEIN, E.L. — Genus II, *Haemophilus*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, c 1984, vol. 1, p. 558-569.
- KILIAN, M. — *Haemophilus*, In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERRMANN, K.L.; ISENBERG, H.D. & SHADOMY, H.J., ed. — *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1991. p. 463-470.
- LEE, I.M.L.; PESSÔA, G.V.A.; ESPER, M.R.N.R.; MELLE, C.E.A. & SIMONSEN, V. — Importância da pesquisa da Beta-galactosidase na caracterização laboratorial da *Neisseria lactamica*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):23-27, 1978.
- MARCHAL, N.; BOURDON, J.L. & RICHARD, C.L. — *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Paris, Doin., 1982. p. 295-299.
- MILIEUX ET RÉACTIFS DE LABORATOIRE PASTEUR. Paris, Institut Pasteur. 1978. p. 186-187.
- MÖLLER, V. — Simplified tests for some aminoacid decarboxylases and for the arginine dehydro-lases system. *Acta. path. microbiol. scand.* 36:158-172, 1955.
- PITTMAN, M. — Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J. Exper. Med.* 53:471-492, 1931.
- ROBBINS, J.B. et alii. — *Haemophilus influenzae* type *b* infections. In: GERMANIER, R., ed., — *Bacterial vaccines*. Orlando, Academic Press, 1984. p. 298-316.
- SHISHIDO, H. & MATSUMOTO, K. — Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type *e* biotype 4. *J. clin. Microbiol.* 10:926-927, 1979.
- SOTTNEK, F.O. & ALBRITTON, W.L. — *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J. clin. Microbiol.* 20:815-816, 1984.
- WENGER, J.D.; HIGHTOWER, W.L.; FACKLAM, R.R.; GAVENTA, S.; BROOME, C. V. & BACTERIAL MENINGITIS STUDY GROUP — Bacterial meningitis in the United States, 1986: Report of a multistate surveillance study. *J. Infect. Dis.*, 162:1316-1323, 1990.
- ZINNEMANN, K. — Newer knowledge in classification, taxonomy and pathogenicity of species in the Genus *Haemophilus*. A critical Review. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I, Abt. Orig. A. 247: 248-258, 1980.

Recebido para publicação em 5 de abril de 1991.

IDENTIFICATION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS, HERPES SIMPLEX VIRUS AND HUMAN PAPILOMAVIRUS IN IRRADIATED UTERINE-CERVIX: CRITICAL ANALYSIS OF POTENTIAL PROBLEMS IN PAPANICOLAOU SMEARS ROUTINE*

Adhemar LONGATTO FILHO**
Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA**
Marina Suheko OYAFUSO***

RIALA6/716

LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M. Y. S. & OYAFUSO, M. S. — Identification of Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus and Human Papillomavirus in irradiated uterine-cervix: critical analysis of potential problems in Papanicolaou smears routine. Rev Inst Adolfo Lutz, 51 (1/2):93-99, 1991.

ABSTRACT: This review present a critical analysis of the morphologic patterns and immunocytochemical reactions of three infections of irradiated uterine cervix: Chlamydia trachomatis, Herpes virus and Papillomavirus. The effect of ionizing radiation on squamous epithelium leads to some alterations of the cytoplasm and nucleus which could difficult the identification of these etiologic agents. Frequently, radiation can induce cytoplasmic vacuolation, multinucleation and bizarre cells features which in some instances can mimich Chlamydia, Herpes or Papilloma infections.

DESCRIPTORS: Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus, Human Papillomavirus, Post radiation smears, Cytology, Immunocytochemistry.

INTRODUCTION

Morphologic alterations inducec by ionizing radiation have been well recognized since the pioneer studies of the first decade of the century as reported by Rubin and Casarett³² about the uterine cervix cancer in biopsies specimens. Later on these patterns were also studied in smears by Graham in 1947⁶, who established cytlogic parameters to the evaluation on the morphologic changes due to radiotherapy(Rxt).

Cytological analysis of gynaecologic smears after Rxt has been a very useful non-invasive method for the follow up of these patients. However, radiation itself can induce several morphologic effects which should be differentiated from residual or recurrent neoplasia^{9,11,13,21,27}.

The most frequent ionizing alterations found in the cytologic smears is cytoplasmic vacuolation. In

addition, there was found multinucleation, anisonucleosis and bizarre cell features^{16,24,26,27,38,41}. These alterations may be found since the first weeks post Rxt till many years later.

These morphologic alterations can difficult the identification of some infections of uterine cervix in irradiated patients. In our personal experience, three infections havebeen recently demostrated in patients treated of cervical cancer with radiotherapy: Chlamydia trachomatis²⁰, Herpes simplex virus¹⁵ and Human Papillomavirus. Epidemiological studies have demonstrated that cervical dysplasia and cancer are associated with factors related to sexual transmission, as these three infections mentioned; so, to identify them is a very important point in the cytologic routine. We would like to present the characteristic morphologic pattern of those infections in the cervical smears of irradiated patients.

* Realizado no Setor de Citologia Oncótica — Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

** Do Instituto Adolfo Lutz

*** Do Hospital A.C. Camargo

Chlamydia trachomatis(Ct):

The first specific infection described in post Rxt smears was that caused by Chlamydia trachomatis²⁰. The real meaning of Ct infection in cervical dysplasia and cancer is still not clearly defined, but its association is important³⁴.

Radiation induces cytoplasmic vacuolation, which should be carefully distinguished from Ct infection. Even in post radiation smears, we can recognize all the classical criteria described by Gupta et alii⁷ as well as the "moth-eaten" features, reported by Gupta et alii in 1988, for Ct.

The identification of Ct infection in post radiation smears is mainly important due to two factors: first, the possibility of Ct infect other cells than those usually described as columnar and metaplastic endocervical cells; since the majority of patients studied until now had an expressive vaginal stenosis due to radiation effects, Ct infected cells belonged to the squamous epithelium of vagina²⁰. The second important fact reported by Maeda et alii²⁰ is the higher Ct frequency in irradiated (4,1%) than that in non-irradiated cancer patients (0,3%) or in cervical screening clinics (0,13 to 0,3%)²⁰.

The morphologic confirmation of Ct infection can be done usually by immunofluorescence^{19,20}, immunocytochemistry^{33,36} in situ hybridization^{5,10} or polymerase chain reaction³¹. All of these methods have a high specificity and sensitivity, and their use in laboratorial routine substituting the culture which require time and costs, is a progressive tendency.

Recently, Iwen et alii¹⁰ analysed DNA probe, direct fluorescent-antibody(DFA) and cell culture for detecting Chlamydia trachomatis in cervical specimens, and reported the similar specificity of both DNA-probe and DFA (98% and 99%, respectively) when compared to the cell culture; and the best sensitivity of DNA-probe (93%) versus DEA.

Ratti et alii³⁰, compared the use of polymerase chain reaction with cell culture and obtained sensitivity and specificity of 100% and 96,8%, respectively.

Ghirardini et alii⁵ reported a control study by in situ hybridization applied in Papanicolaou-stained cervical smears, for the use of laboratorial routine: the sensitivity and specificity of Pap test compared with in situ hybridization were 95% and 89%, respectively.

In our experience, immunofluorescence and immunocytochemistry provide good results to confirm Ct infection morphologically reported in metaplastic-like cells with fine vacuolation called as "moth-eaten"^{20,33}, or in presence of the "nebulous" type (second phase of the cycle) appearance³⁶.

Both methods can also exhibit negative reactions in morphologically positive cases, namely by immunocytochemical reaction. These findings are frequently credited to the different phases of the Ct cycle that can hide natural reactivity of the infection^{20,33,36}.

Recently, cytobrush an accurate device of material collection of squamous-collunar junction, have yielded improved results to the identification of Chlamydia trachomatis in screening clinics routine through the morphological and immunofluorescent methods¹⁹.

Further studies in post radiation patients without severe vaginal stenosis could bring new information about the incidence of Ct in this group with this new efficient collection device.

Herpes simplex virus(HSV):

For years, several studies have associated HSV infection and cervical carcinoma²⁹; so, the finding of HSV infection in post-radiation cervical smears revealed new perspectives of this association, since the future studies can research the presence of HSV in cervical biopsies before and after Rxt. In recent study, we failed to identify HSV in biopsies prior Rxt, even though we have used in situ hybridization method¹⁵.

Papanicolaou stained smears detect HSV patterns with high accuracy, since the first description of Stern and Longo in 1963³⁹; others studies have confirmed the cellular features of HSV infection³⁷ morphologically or through the viral isolation¹⁴, immunoperoxidase^{15,40} or in situ hybridization techniques^{15,40}; in our personal experience we have used only the last two proceedings.

The multinucleation due to ionizing alterations can simulate HSV cytopathic effect; besides that, the cases we have recognized in cytologic follow-up routine, shows the classical signs of HSV infection, such as multinucleation with molding of nuclei and a ground-glass appearance of the chromatin. The cytoplasm was in general, abundant, pale and finely granular in some cells; others had only a narrow perinuclear rim of cytoplasm; bizarre giant forms are frequently seen¹⁵.

Immunocytochemical research with HSV antigen can present positivity in cells with or without morphological signs of HSV infection¹⁵.

Based on our previous experience¹⁵, three hypotheses could be raised regarding major factors which affect defense mechanisms and facilitate viral infections: 1) the nature of the epithelium that replaces neoplastic cells; 2) the environmental alterations induced by radiation or 3) a hypothetical local immunodepression.

Human Papillomavirus (HPV):

The association of HPV infection and cervical cancer has been exhaustively studied^{23,28}.

Its occurrence in post Rxt smears require further epidemiologic investigations in this group, in order to clarify whether HPV acts in such condition, as an opportunistic agent to the aggressive Rxt or it has been present in this cervix since early events of the development of cervical cancer.

The first cases we described of HPV infection in post Rxt smears were composed by epithelial cells with scanty or absent alterations of ionizing effects: this fact led us to think that HPV infection could be related with the eutrophic appearance of the cells. However, afterwards, we have found classical signs of HPV infection, even in the smears of atrophic appearance which frequently reveals a good response to the treatment^{16,24,26}.

Pap smears can present many signs suggestive of HPV infection that proved a high index of agreement with the specific means to recognize the virus^{3,4,22,35}, such as immunocytochemistry¹⁸, in situ hybridization^{1,25,35} or the recent polymerase chain reaction^{2,25}.

In our experience, the major morphological sign detected as suggestive of HPV infection in post radiation smears, was the classical koilocyte, in general associated with nuclear hyperchromasia and dyskeratosis^{12,22}. Additional features of HPV infection such as "bi or multinucleation", "mild koilocytosis", "hyperchromatic nuclei", "clear cytoplasm", "keratohyalin granules", "perinuclear halos", "condensed filaments", and "spindle cells"^{3,17,35} could not help in this special setting due to the similar effects caused by the ioniz-

ing radiation. We have noticed no Rxt effect mimicking koilocyte.

We have found out (unpublished data), that positive immunocytochemical reactions were found in cells with HPV classical signs and in others with no morphological suggestion of the HPV infection. All reactivity was observed in nuclei. All biopsy specimens previous to radiation examined by in situ hybridization with highly sensitive biotin-probes, were negative. The results led us to think in morbidity post-treatment, although the hypothesis of HPV DNA degradation in the formalin-fixed paraffin embedded cancer specimens cannot be ruled out²⁵.

FUTURE PERSPECTIVES

To improve new means to evaluate the real importance of these infections, further studies which assort, beyond the cytological and immunocytochemical proceedings and a complete follow-up of the patients, prior and after treatment by radiation, are required. To answer the question about the hypothetical resistance of these etiologic agents to the radiation, several efforts should be done to exclude the probable morbidity postherapeutic. Epidemiological view requires also an explanation about the frequency of these infections in irradiated patients, in order to obtain information important enough to the knowledge of the special cellular habitat; and more, a question raised: do the patients who present these infections, mainly by HPV, present a higher risk to neoplastic recurrence?

RIALA6/716

LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S. & OYAFUSO, M.S. — Identificação de Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus e Papilomavirus humano em colo uterino irradiado. Análise crítica de um problema em potencial em esfregaços rotineiros de Papanicolaou. Rev Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 93-99, 1991.

RESUMO: A presente revisão faz análise crítica de padrões morfológicos e imunocitoquímicos de três distintas infecções em colo uterino irradiado: Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus e Papilomavirus. Os efeitos ionizantes sobre os epitélios escamosos, levam a algumas alterações núcleo-citoplasmáticas, multinucleação e às formas celulares bizarras as quais, em algumas circunstâncias, podem mimetizar as infecções por Chlamydia, Herpes ou Papilomavirus.

DESCRITORES: Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus, Papilomavirus humano, esfregaços pós-irradiação, citologia, imunocitoquímica.

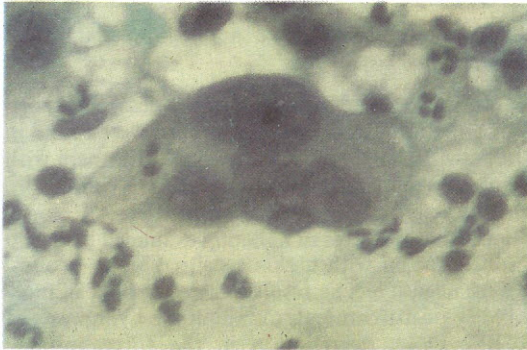


FIGURE 1

Giant cell with marked Effects of radiation as nonspecific multinucleation with anisonucleosis of cytoplasm. (x 500 Papanicolaou)

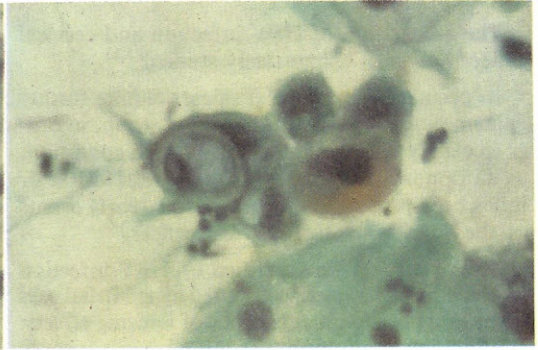


FIGURE 2

Major effects of radiation include marked nonspecific intracytoplasmic vacuoles (x 500 Papanicolaou).

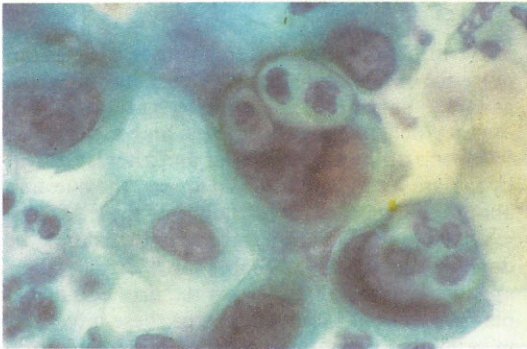


FIGURE 3

Other effects of radiation on squamous cells include intracytoplasmic inclusion of neutrophils and mild vacuolation (x 1250 Papanicolaou).

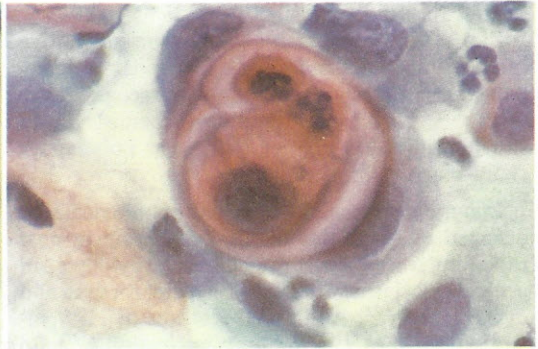


FIGURE 4

Bizarre findings after radiation on squamous cells as aberrant vacuolation with peculiar "cell within a cell feature" separating two hyperchromatic nuclei. (x 1250 Papanicolaou).

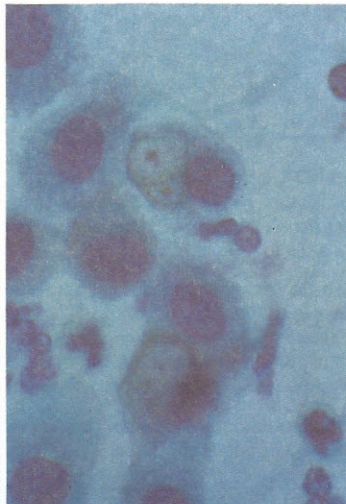


FIGURE 5 e 6

Chlamydia-infected cells after radiation with typical vacuolated cells show intracytoplasmic vacuoles with multiple cocoid bodies and central target formation (compare these pictures with Fig.2) (x 800 Papanicolaou)

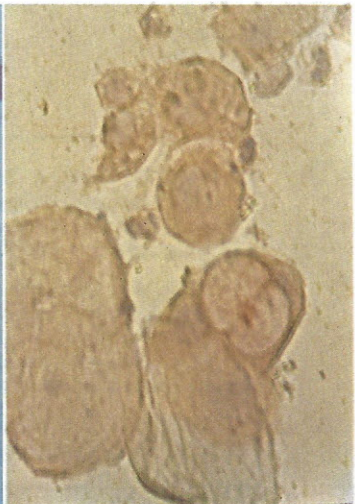


FIGURE 7

Positive immunoperoxidase reaction to Chlamydia trachomatis on irradiated squamous cell (x 500 Papanicolaou).



FIGURE 8

Giant cell with multinucleated syncytial conglomerates with prominent inclusions on enlarged bizarre cytoplasm in post radiated smear with HSV pathognomonic cytologic appearance (X 320 Papanicolaou).

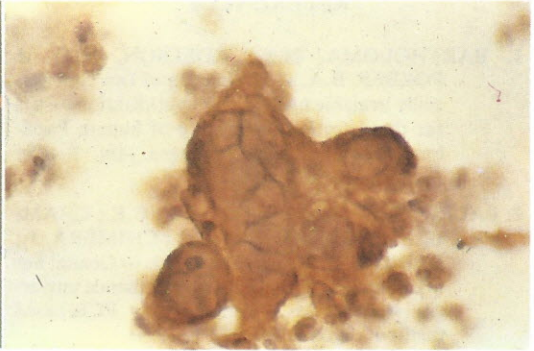


FIGURE 9

Positive staining for HSV antigen with multinucleated cell (x 500 Papanicolaou).

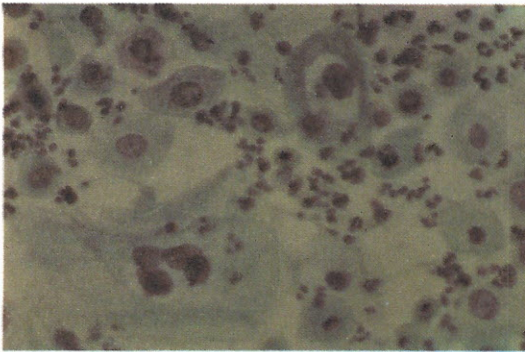


FIGURE 10

Multinucleation and koilocytosis suggestive of HPV infection in cell with marked effects of radiation injury and atrophic appearance (x 400 Papanicolaou).

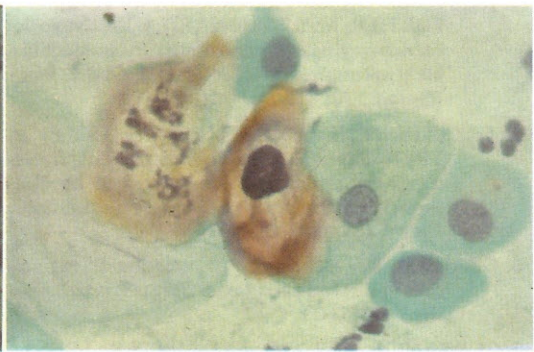


FIGURE 11

A single cell with koilocytosis suggestive of HPV infection beside a cell with marked degenerated signs of radiation (x 500 Papanicolaou).

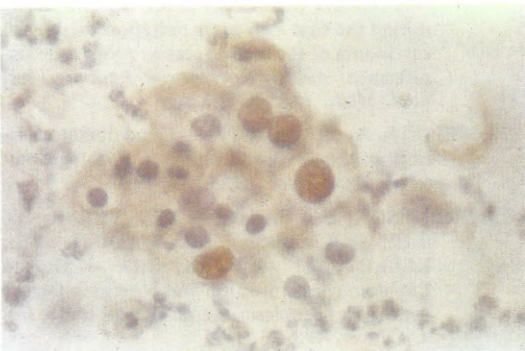


FIGURE 12

HPV antigen was found in many nuclei in a cluster of cells with radiation effect (x 400).

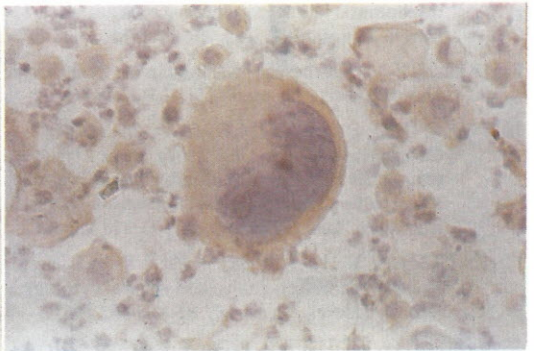


FIGURE 13

Nonspecific multinucleated giant cell of the same smear of Fig. 12, with negative reaction the HPV antigen (x 400 Papanicolaou).

LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S. & OYAFUSO, M.S. — Identification of Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus and Human Papillomavirus in irradiated uterine-cervix: critical analysis of potential problems in Papanicolaou smears routine. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 51 (1/2):93-99, 1991.

REFERENCES

1. BARTHOLOMA, N.Y.; ADELSON, M.D. & FORBES, B.A. — Evaluation of two commercially available nucleic acid hybridization assays for the detection and typing of human Papillomavirus in clinical specimens. *Am. J. clin. Pathol.*, 95: 21-9, 1991.
2. BAUER, H.M.; TING, Y.; GREER, C.E.; CHAMBERS, J.C.; TASHIRO, C.J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A. & MANOS, M. — Genital human Papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*, 265:472-7, 1991.
3. CAVALIERE, M.J.; LONGATTO FILHO, A.; PEREIRA, G.M.C.; MAEDA, M.Y.S. & DI LORETO, C. — Papillomavirus em saúde pública: importância de aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform. Union*, 15: 24-39, 1990.
4. DEWAILLY DODINS.; BRISSON, J.; ROY, M.; FORTIER, M. & BOUCHARD, C. — Cytologic cervico-vaginale et condylomes. Reproductibilité et valeur prédictive. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 20: 519-24, 1991.
5. GUIRARDINI, C.; GHINAZI, P.; RAISI, F. & TREINTINI, G.O. — Detection of Chlamydia trachomatis in Papanicolaou stained cervical smears: control study by in situ hybridization. *Diagn. Cytopathol.* 7: 221-4, 1991.
6. GRAHAM, R. — The effect of radiation on vaginal cells in cervical carcinoma. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 84:153-73, 1947.
7. GUPTA, P.K.; LEE, E.F.; EROZAN, Y.S.; FROST, J.K.; GEDDES, ST. & DONOVAN P.A. — Cytologic investigations in Chlamydia infection. *Acta cytol.* 23:315-29, 1979.
8. GUPTA, P.K.; SURBAJI, M.S.; MENTOR, L.J.; ER-MATINGER, S.U.; MYERS, J. & QUINN, T.C. — Cytopathologic detection of Chlamydia trachomatis in vaginopancervical (Fats smears. *Diagn. Cytopathol.*, 4 : 224-9, 1988.
9. HALL, J.E. — Posttherapy cytology in cervical carcinoma. *Obstet. Gynecol.*, 9: 733-4, 1957.
10. IWEN, P.C.; BLAIR, T.M.H. & WOODS, G.L. — Comparison of the Gen-Probe Pace 2TM system, direct fluorescent-antibody, and cell culture for detecting Chlamydia trachomatis in cervical specimens *Am. J. clin. Pathol.*, 95:578-82, 1991.
11. KAUFMAN, R.H.; TOPEK, N.H. & WALL, J.A. — Late irradiation changes in vaginal cytology. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 81:859-66, 1961.
12. KOSS, L.G. & DURFEE, G.R. — Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix, cytologic and pathologic study of Koilocytotic atypia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 63:1235-61, 1956.
13. KOSS, L.G.; LELLAMED, M.R. & DANIEL, W.W. — In situ epidermoid carcinoma of the cervix and vagina following radiotherapy for cervical cancer. *Cancer*, 14: 353-60, 1961.
14. LAFFERTY, W.E.; KROFT, S.; REMINGTON, M.; GEDDINGS, R.; WINTER, C.; CENT, A. & COREY, L. — Diagnosis of Herpes simplex virus by fluorescent and viral isolation from samples of external genital lesions in a high-prevalence population. *J. Clin. Microbiol.*, 25:323-6, 1987.
15. LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S.; OYAFUSO, M.S., KANAMURA, C.T. & ALVES, V.A.F. — Herpes simplex virus in post-radiation cervical smears: a morphologic and immunocytochemical study. *Acta Cytol.*, 34:652-6, 1990.
16. LONGATTO FILHO, A.; OYAFUSO, M.S. MAEDA, M.Y.S.; SHIH, L.W.S.; CAVALIERE, M.J. & BORTOLAN, J. — Importância da citologia no follow-up de carcinomas uterinos irradiados. II. Efeitos tardios (após 12 meses). *Acta Oncol. bras.*, 9:45-50, 1989.
17. LUZZATTO, R.; RECKTENVALD, M. & PORTUGAL, J.P.L. — Multinucleation and abortive cellular division in human Papillomavirus infection. *Acta Cytol.*, 34: 286-7, 1990.
18. MCMILLAN, A.; BISHOP, P. E. & FLETCHER, S. — An immunohistological study of condylomata acuminata. *Histopathology*, 17: 45-52, 1990.
19. MAEDA, M.Y.S.; LONGATTO FILHO, A.; SANTOS, D.R.; CAVALIERE, M.J.; SHIH L.W.S. & OYAFUSO, M.S. — A comparison of Papanicolaou and immunofluorescent staining in smears obtained by Ayre's spatula and cytobrush. *Pathologica*, 83: 105-9, 1991.
20. MAEDA, M.Y.S.; LONGATTO FILHO, A.; SHIH, L.W.S.; CAVALIERE, M.J. & M.S.; MARZIONA, F.; SANTOS, D.R. & CARVALHO, M.I. — Chlamydia trachomatis in cervical uterine irradiated cancer patients. *Diagn. cytopathol.*, 6:86-8, 1990.
21. MARCIAL, V.A.; BLANCO, M.S. & DE LEÓN, E. — Persistent tumor cells in the vaginal smears during the first year after radiation therapy of carcinoma of the uterine cervix: prognostic significance. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. nucl. Med.*, 102:170-5, 1968.
22. MEISELS, A. & FORTIN, R. — Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.*, 20:505-9, 1976.
23. MORRISON, E.A.B.; HO, G.Y.F.; VERMUND, S.H.; GOLDBERG, G.L.; KADISH, A.S.; KELLEY, K.F. & BURK, R.D. — Human Papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int. J. Cancer*, 49:6-13, 1991.
24. MURAD, T.M. & AUGUST, C. - Radiation induced atypia: a review. *Diagn. Cytopathol.*, 1:137-52, 1985
25. NUOVO, G.J.; DURFLER, M.M.; IMPRAIM, C.C. & BROMLEY, S.E. - Occurrence of multiple types of human Papillomavirus in genital tract

LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S. & OYAFUSO, M.S. — Identification of Chlamydia trachomatis, Herpes simplex virus and Human Papillomavirus in irradiated uterine-cervix: critical analysis of potential problems in Papanicolaou smears routine. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 51 (1/2):93-99, 1991.

- lesions. Analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.*, 138:53-8, 1991.
26. OYAFUSO, M.S.; LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S.; SHIH, L.W.S.; CAVALIERE, M.J. & BORTOLAN, J. — Importância da citologia no follow-up de carcinomas do colo uterino irradiados. I. Efeitos imediatos (até 12 meses). *Acta Oncol. bras.*, 9:17-20, 1989.
27. PATTEN, S.F. — Postradiation dysplasia of the uterine cervix: cytopathology and clinical significance. In: *Compendium on diagnostic Cytology*. Edited by G.L. Wied et alii. 6th ed. Chicago, Tutorials of cytology, 1988. p.267-70.
28. PECORARO, G., LEE, M.; MORGAN, D & DEFENDI, V. — Evolution of in vitro transformation and tumorigenesis of HPV 16 and HPV 18 immortalized primary cervical epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 138:1-8, 1991.
29. PRAKASH, S.S.; REEVES, W.C.; SISSON, G.R.; BRENES, M.; GODOY, J.; BACHETTI, S.; BRILTON, R.C. & RAWLS, W.E. — Herpes simple virus type 2 and human papillomavirus type 16 in cervicitis, dysplasia and invasive cervical carcinoma. *Int. J. Cancer*, 35:51-7, 1985.
30. RATTI, G.; MORONI, A. & CEVENINI, R. — Detection of Chlamydia trachomatis DNA in patients with non-gonococcal urethritis using the polymere chain reaction. *J. clin. Pathol.*, 44:564-68, 1991.
31. ROTKIN, I.D. — A comparison review of epidemiologic studies in cervical related to current search for transmissible agents. *Cancer Res.*, 33:1353-67, 1973.
32. RUBIN, P. & CASARETT, G.W. — The female genital tract. In: *Clinical radiation pathology*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1968, v.1, cap. 11, p.396-422.
33. SANTOS, D.R.; LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S.; OYAFUSO, M.S.; SHIH, L.W.S., CAVALIERE, M.J. MARZIONA, F. & CARVALHO, M.I. — Chlamydia trachomatis em esfregaços de colo uterino irradiado: aspecto citológicos e imunocitoquímicos. *Rev. Paul. Med.*, 107: 229-32, 1989.
34. SCHATER, J.; HILL, E.C.; KING, E.B.; HEILBRON, D.C.; RAY, R.M.; MARFOLIS, A.J. & GREENWOOD, S.A. — Chlamydia trachomatis and cervical neoplasia. *JAMA*, 248:2134-8, 1982.
35. SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G., DE VILLARES, E.M. & GISSMANN, L. — Sensivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn. Cytopathol.*, 3:240-55, 1987.
36. SHIINA, Y. & KOBAYASHI, T.K. — Detection of Chlamydia trachomatis by Papanicolaou stained smear and its limitations. *Diagn. Cytopathol.*, 6:148-51, 1990.
37. SONG, S.H. — Herpes simplex virus infection detected on routine gynecologic cell specimens. *Acta Cytol.*, 13:354-8, 1969.
38. SOOST, H.J. & BAUR, S. — Anormalidades celulares tras la radioterapia y la administracion de citostáticos. In: *Diagnóstico citológico en ginecologia*. Version de C.B. Rodriguez y D.R. Mujal. Barcelona, Ed. Toray, 1993. p. 280-98.
39. STERN, E. & LONGO, L.D. — Identification of Herpes simplex virus in a case showing cytological feature of viral vaginitis. *Acta Cytol.*, 7:295-9, 1963.
40. TOMITA, T.; CHIGA, M.; LENAHAAN, M. & BALACHANCHAN, N. — Identification of Hesper simplex virus infection by immunoperoxidase and in situ hybridization methods. *Virchows Arch. Abt.A. Pathol. Anat.*, 419:99-105, 1991.
41. VON HAAM, E. — Radiation cell changes. In: *Compendium on diagnostic Cytology*. Edited by G.L. Wied et alii. 6th ed. Chicago, Tutorials of Cytology, 1988. p.239-53.

Recebido para publicação em 17 de abril de 1991.

ANTICORPOS SÉRICOS IgA NO DIAGNÓSTICO DA FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI HUMANA

Herminia Yohko KANAMURA*
Rita Maria SILVA**
Ana Lúcia T. RABELLO***
Roberto S. ROCHA***
Naftale KATZ***

RIALA6/717

KANAMURA, H. Y.; SILVA, R. M.; RABELLO, A. L. T.; ROCHA, R. S.; KATZ, N. — Anticorpos séricos IgA no diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansoni humana. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 101-104, 1991.

RESUMO: Anticorpos IgA e IgM contra antígenos de natureza polissacarídica, presente nas células epiteliais do tubo digestivo do *Schistosoma mansoni* foram detectados por técnica de imunofluorescência indireta, utilizando-se como substrato antigênico cortes parafinados de vermes adultos fixados em solução de Rossman. Amostras de soros de 40 pacientes esquistossomóticos, 20 na fase aguda e 20 na fase crônica, e de 40 indivíduos, não esquistossomóticos foram estudadas. Anticorpos da classe IgA foram observadas em 15 dos 20 pacientes da fase aguda e em apenas 1 da crônica. Anticorpos IgM foram detectados em 90% (36/40) dos pacientes esquistossomóticos estudados, 19 agudos e 17 crônicos. Nenhuma reação positiva foi observada entre os não esquistossomóticos incluídos neste estudo.

DESCRITORES: Esquistossomose mansônica. Diagnóstico. Anticorpos. Fase Aguda e Fase crônica.

INTRODUÇÃO

Anticorpos IgA são detectados em pacientes com esquistossomose aguda pela técnica de imunofluorescência indireta (RIF), enquanto anticorpos IgM e IgG tanto na fase aguda como na fase crônica da doença (10). Anticorpos IgA e IgM apresentam reatividade dirigida especificamente contra estruturas relacionadas ao tubo digestivo (TD) do verme adulto^{10,11}. A utilização da RIF de cortes de vermes incluídos em parafina^{2,17,19} mostrou ser a pesquisa de anticorpos da classe IgM contra antígeno polissacarídico de TD, mais sensível e específica do que a pesquisa de anticorpos IgG, para fins diagnósticos das fases aguda e crônica da esquistossomose mansoni.

Na fase aguda, anticorpos IgM anti-TD apare-

cem em níveis mais elevados do que na fase crônica^{10,11}; entretanto, a diferenciação entre fases aguda e crônica baseada em anticorpos IgM TD específicos é pouco prática e pouco eficiente.

No presente trabalho, avalia-se a utilidade diagnóstica dos anticorpos séricos IgA e IgM contra TD e da técnica de RIF com cortes parafinados de vermes adultos do *Schistosoma mansoni*, na diferenciação das fases aguda e crônica da esquistossomose humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros — Foram obtidas amostras de soros de 20 pacientes, do sexo masculino, idade entre 18 e 19 anos, na fase aguda da esquistossomose mansônica¹. Todos os pacientes apresentavam

* Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

** Instituto Adolfo Lutz-Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo.

*** Centro de Pesquisa "Renê Rachou" - FIOCRUZ.

ovos de *S. mansoni* nas fezes pelo método de Kato/Katz (mínimo: 6, máximo: 462, média 127 ovos por grama de fezes — ogf). Foram estudados também soros de 20 pacientes do sexo masculino, entre 18 e 19 anos, na fase crônica da esquistossomose, forma intestinal, eliminando ovos de *S. mansoni* nas fezes (mínimo: 4, máximo: 944, média 154 ogf).

Foram ainda incluídos no estudo amostras de soros de 40 pacientes com exames de fezes negativos para *S. mansoni* sendo 20 de indivíduos clínica e laboratorialmente normais e 20 de indivíduos com outras afecções como: Ascaridíase¹⁰, Ancilostomíase⁵, protozooses intestinais⁵.

Antígeno — Vermes adultos de *S. mansoni* foram fixados em solução fixadora de Rossman por 2 horas à temperatura ambiente e após desidratação, por metodologia convencional em meio de etanol absoluto e xilol, incluídos em Paraplast (MONOJECT CIENTIFICO, Div, Sherwood Medial, St. Louis, MO, USA), de acordo com técnica já descrita^{15,17}. As lâminas com os cortes de vermes parafinados foram desparafinizadas e reidratadas de forma convencional em banhos sucessivos de xilol e de etanol em diferentes concentrações (96,70,50 e 30%), sendo o último banho em água destilada. As lâminas assim preparadas foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

Reação de imunofluorescência (RIF) — A RIF, utilizando como substrato antigênico cortes de vermes adultos parafinados foi realizada segundo metodologia já descrita^{2,17}.

Conjugados fluoresceinados comerciais anti IgM humana (Biolab Merieux, Rio de Janeiro, Brasil)

e anti-IgA humana (Hyland Div. Travenol Lab., USA) mono-específicos para as cadeias pesadas, respectivamente μ e α , foram utilizados diluídos em solução de azul de Evans a 2 mg% em solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M, pH 7,2 (SSTF), de acordo com seus títulos ótimos de uso, previamente determinados por titulação em bloco com soros padrão positivo e negativo.

Os soros de pacientes foram diluídos em SSTF a 1/10, para detecção de anticorpos IgA, e 1/20, para IgM^{10,11}.

A leitura das lâminas de RIF foi feita em estudo cego, em microscópios de imunofluorescência com sistema de epi-iluminação.

Foram consideradas como positivas as RIF com presença de fluorescência de cor verde maçã apenas nas estruturas relacionadas ao tubo digestivo do verme^{10,17}; fluorescência a nível de membrana ou de parênquima foram consideradas como inespecíficas e não válidas como positivas para fins diagnósticos da esquistossomose.

RESULTADOS

Os resultados quanto à positividade da reação de imunofluorescência (RIF), para anticorpos IgA e IgM, nos 40 pacientes esquistossomóticos, classificados de acordo com a fase clínica, aguda ou crônica, estão apresentados na Tabela 1. O único paciente em fase aguda que não apresentou anticorpos IgM foi também negativo para IgA.

Não foi observada reatividade de IgM ou IgA nos soros dos 40 indivíduos não esquistossomóticos incluídos neste estudo.

TABELA 1

Positividade da RIF em cortes de vermes parafinados em soros de pacientes com forma aguda e crônica de esquistossomose de acordo com a classe de imunoglobulina do anticorpo.

FORMA CLÍNICA	Nº PACIENTES	RIF			
		IgA		IgM	
		Nº	%	Nº	%
Aguda	20	15	75%	19	95%
Crônica	20	1	5%	17	85%
Total	40	16	40%	36	90%

DISCUSSÃO

A pesquisa de anticorpos da classe IgA contra estruturas antigênicas do epitélio intestinal do *S. mansoni*, como já anteriormente observado pela RIF em cortes de vermes congelados^{10,11} proporciona um instrumento importante capaz de discriminar entre esquistossomose aguda e crônica.

A possibilidade de detectar esses anticorpos através de cortes de vermes parafinados torna a RIF

um teste prático e de interpretação fácil, sendo possível armazenar as lâminas em temperatura ambiente por período de pelo menos três meses, o que viabiliza a realização dos testes por centros de pesquisa que não mantêm o ciclo do parasita. O fixador de Rossman utilizado na preparação dos vermes preserva a antigenicidade das estruturas relacionadas ao tubo digestivo e reduz ou elimina a antigenicidade de outras partes do verme^{2,17}.

Várias preparações antigênicas e testes soroló-

gicos têm sido avaliados na tentativa de se obter metodologia sorológica útil capaz de diferenciar a fase aguda da crônica na esquistossomose^{3,4,6,9,14}. A utilização de antígenos de cercárias comparativamente ao de verme adulto pelas técnicas de ELISA, RHA e RIF^{7,11,13} mostrou que a reatividade contra antígeno cercariano era mais evidente na fase aguda do que na crônica, ocorrendo o inverso com antígenos de verme adulto. Níveis de anticorpos IgM são mais elevados nas fases iniciais da esquistossomose^{10,14}. Entretanto, a determinação dos níveis de anticorpos é pouco prática e não permite a distinção entre infecção aguda e crônica, devido às variações individuais que ocorrem na indução da resposta imune^{12,15,18}.

É possível a diferenciação entre esquistossomose aguda e crônica pela determinação de anticorpos IgG e IgM contra o KLH (Keyhole limpet hemocyanin), hemocianina do molusco marinho *Me-*

gathura crenulata, que apresenta epitopos semelhantes aos de superfície do esquistossomulo⁸. Esses anticorpos estão presentes apenas na fase aguda da esquistossomose¹⁴.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a RIF em cortes de vermes parafinados constitui teste útil no diagnóstico da esquistossomose pela determinação de IgM e no diagnóstico diferencial da fase aguda, através da pesquisa de anticorpos da classe IgA.

AGRADECIMENTOS

Às pesquisadoras científicas Maria Ivani P.G. Silva e Sylvia A.G. Velloso e à técnica Eliane T. Garcia pela colaboração na manutenção do ciclo e obtenção de antígenos do *S. mansoni* e à Sra. Sueli Providelo pela parte datilográfica.

RIALA6/717

KANAMURA, H. Y.; SILVA, R. M.; RABELLO, A. L. T.; ROCHA, R. S.; KATZ, N. — IgA antibodies in the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 101-104, 1991.

ABSTRACT: Specific IgA and IgM antibodies to a polysaccharide antigen present in the epithelial cells of the schistosome gut were measured by an indirect immunofluorescence technique, using paraffin sections of adult worms fixed in Rossman's fixative. Sera from 40 schistosomiasis patients, 20 acute and 20 with chronic form, and also from 40 individuals with no schistosome infection were examined. Of the 20 acute patients, 15 (75%) had IgA antibodies, whereas only one of the 20 in the chronic stage was positive for IgA. IgM antibodies were detected in 19 of the acute patients and in 17 of the chronic ones (90% positivity).

No positive reaction was observed among non-schistosomiasis patients.

DESCRIPTORS: Schistosomiasis mansoni, Diagnosis. Antibodies. Acute phase. Chronic phase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COSTA, M.F.F.L.; ROCHA, R.S.; ZICKER, F. & KATZ, N. — Evaluation of schistosomiasis in a hyperendemic area of the Minas Gerais state: two cross sectional studies. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 27: 279-285, 1985.
2. DEELDER, A.M. & KORNELIS, D. — A comparison of the IFA and the ELISA for the Demonstration of Antibodies Against Schistosome Gut-Associated Polysaccharide Antigens in Schistosomiasis. Z. Parasitenk., 64(1): 65-75, 1980.
3. DEELDER, A.M. & KORNELIS, D. — Immunodiagnosis of recently acquired Schistosoma mansoni infection. A comparison of various immunological techniques. Trop. geogr. Med. 33: 36-41, 1981.
4. DEELDER, A.M.; KORNELIS, D.; MARBIN, M.; NOORDPOOL, H.N.; GODFRIED, R.M.; ROTMANS, J.P. & OOSTBURG, B.F.J. — Applicability of different antigen preparations in the enzyme — linked immunosorbent assay for Schistosomiasis mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29(3): 401-410, 1980.
5. DEELDER, A.M.; KORNELIS, D.; VAN MARCK, E.A.E.; EVELEIGH, P.C. & EDMOND, J.G. — Schistosoma mansoni: Characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. Exp. Parasitol., 50: 16-32, 1980.
6. EVERGARD, B.; HAMMARSTROM, L.; SMITH, C.I.E. & LINDER, E. — Early antibody responses in human schistosomiasis. Clin. exp. Immunol., 80: 69-76, 1990.
7. FELDMEIER, H. & BUTTNER, D.W. — Immunodiagnosis of Schistosomiasis mansoni in man. Application of crude extracts from adult worms and cercariae in the I.H.A. and the ELISA. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. OrigA 255: 413-421, 1983.

8. GRZYCH, J.M.; DISSOUS, C.; CAPRON, M., TORRES, S.; LAMBERT, P.H. & CAPRON, A. — *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitopes with Keyhole limpet hemocyanin. J. exp. Med., 165: 865-878, 1987.
9. JASSIM, A.; HASSAN, K & CATTY, D. — Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. Parasite: Immunology, 9: 627-650, 1987.
10. KANAMURA, H.Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E. & SILVA, L.C. — Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of Schistosomiasis mansoni. Am. J. trop. Med. Hyg., 28(2): 242-248, 1979.
11. KANAMURA, H.Y. — Antigenos de diferentes formas evolutivas do *S. mansoni* para diagnóstico e acompanhamento sorológicos de pacientes submetidos à quimioterapia. São Paulo, 1985, 109 p. [Tese de Doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas — Universidade de São Paulo].
12. LEAL-BACELAR, G.M.J.P. — Padronização e avaliação da técnica ELIEDA para fins diagnósticos e acompanhamento de pacientes tratados. São Paulo, 1989, 103 p. [Dissertação de Mestrado — Faculdade de Ciências Farmacêuticas — Universidade de São Paulo].
13. LUNDE, M.N. — OTTESEN, E.A. & CHEEVER, A.W. — Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by Enzyme-Linked — Immunosorbent Assay (ELISA). Am. J. trop. Med. Hyg., 28(1): 87-91, 1979.
14. MANSOUR, M.M.; ALI, P.O.; FARID, Z.; SIMPSON, A.J.G. & WOODY, J.W. — Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet hemocyanin. Am. J. trop. Med. Hyg., 41(3): 338-344, 1989.
15. MOTT, K.E. & DIXON, H. — Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. Bull. W.H.O., 60(5): 729-753, 1982.
16. NASH, T.E. — Localization of the circulating antigen within the gut of *S. mansoni*. Am. J. trop. Med. Hyg., 23: 1085-1087, 1974.
17. NASH, T.E. — Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. Am. J. trop. Med. Hyg., 27(5): 938-943, 1978.
18. RUIZ-TIBEN, E.; HILLYER, G.V.; KNIGHT, W.B.; GOMEZ de RIOS, I. & WOODALL, J.P. — Intensity of infection with *Schistosoma mansoni*: Its relationship to the sensitivity and specificity of serologic tests. Am. J. trop. Med. Hyg., 28(2): 230-236, 1979.
19. SAUNERON, M.F.; APPRIU, M. RIPERT, Ch., TRIBOULEY — DURET, J. & TRIBOULEY, J. — Étude par la réaction d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre les antigenes de l'épithélium intestinal de *Schistosoma mansoni*. Ann. Parasitol. Hum. Com. 60(2): 147-154, 1985.

Recebido para publicação em 23 de agosto de 1991.

DETECÇÃO DE ANOREXÍGENOS E BENZODIAZEPÍNICOS EM FORMULAÇÕES "NATURAIS" EMPREGADAS EM REGIMES DE EMAGRECIMENTO*

Mariangela Tirico AURICCHIO**
Mônica Arcon BATISTIC**
Blanca E. Ortega MARKMAN**

RIALA6/718

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & MARKMAN, B.E.O. - Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações "naturais" empregadas em regimes de emagrecimento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):105-110, 1991.

RESUMO: Foram analisadas 74 amostras de formulações 'naturais' destinadas a regimes de emagrecimento com o intuito de se verificar a presença de anorexígenos e benzodiazepínicos, que são substâncias de uso controlado. Empregou-se, para tanto, a cromatografia em camada delgada e a espectrofotometria na região do ultra-violeta. Apesar de serem apresentadas como produtos naturais, em 50% destas preparações detectou-se a presença de anorexígenos e benzodiazepínicos. Os componentes naturais presentes foram identificados por análise microscópica e cromatográfica. Constatou-se que substâncias controladas estão sendo empregadas indiscriminadamente em formulações 'naturais' para regime, sem serem mencionadas na rotulagem.

DESCRIPTORIOS: formulações naturais para regimes de emagrecimento; anorexígenos, benzodiazepínicos, detecção, cromatografia em camada delgada; espectrofotometria na região do ultravioleta.

INTRODUÇÃO

A utilização de formulações para emagrecimento tem seu emprego baseado em dois conceitos sustentados pelo modismo que nos cerca¹⁷, ou seja, o culto à magreza como padrão de beleza e o consumo de produtos naturais como hábito saudável. Tais preparações seriam totalmente livres de efeitos colaterais, o que é extremamente desejável, em detrimento da utilização de produtos sintéticos, tanto na alimentação, como na cosmética e medicamentos.

Dentro deste contexto, a homeopatia foi, no início, a alternativa encontrada para o desejado retorno ao naturalismo, e foi erroneamente confundida com a fitoterapia, já que as formulações têm geralmente em comum a presença de vários componentes de origem natural aos quais são atribuídos propriedades emagrecedoras.

Ocorre que muitos pacientes aos quais tais medicamentos naturais ou homeopáticos foram prescritos, relatavam sintomas indesejáveis e reações colaterais graves.

A maioria das solicitações de análises em nosso laboratório relatavam a preocupação com a verificação do conteúdo das formulações. Estas, normalmente eram adquiridas no próprio consultório médico e raramente apresentavam a composição, que muitas vezes era codificada. Como estes medicamentos produziam realmente o emagrecimento, o consumo aumentou consideravelmente. Por conseguinte, passaram a ser adquiridos livremente em farmácias e drogarias.

Na literatura não se encontram evidências científicas comprovando que as substâncias vegetais empregadas nessas preparações provoquem o emagrecimento.

* Realizado na Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 8º Congresso Paulista de Farmacêuticos, São Paulo, 1991.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

grecimento tão acentuado em período tão curto de utilização. Assim sendo, surgiu o interesse em pesquisarem-se substâncias químicas sintéticas conhecidas como moderadores de apetite e empregadas em medicamentos de uso controlado pela portaria nº 28⁵.

Inicialmente, as amostras foram enviadas à Seção de Farmacognosia por consumidores que já estavam utilizando as formulações e pelos que iriam iniciar o tratamento de emagrecimento. Posteriormente, os Órgãos de Vigilância Sanitária e de Defesa do Consumidor passaram a encaminhar à Seção amostras desse tipo de medicamento, devido às queixas e dúvidas dos usuários.

A pesquisa dos benzodiazepínicos e anorexígenos foi feita empregando-se principalmente as técnicas de cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região do ultravioleta.

A cromatografia em camada delgada vem sendo utilizada para a detecção destes grupos desde a década de 60^{7,12,21} e ainda hoje é de grande utilidade. A literatura apresenta também várias possibilidades de sistemas cromatográficos passíveis de serem utilizados^{1,7,8,11,12,13,16,18,21,25}. No entanto, observou-se na prática, que o desempenho nem sempre é satisfatório quando benzodiazepínicos e anorexígenos estão presentes em associações. Vários autores^{6,8,13,22} preocuparam-se em estabelecer correlações entre a estrutura dos grupos de substâncias químicas e seu comportamento cromatográfico (Rf). Estes estudos, no entanto, foram feitos em grupos isolados de substâncias químicas (neutra, básica e ácida)¹³. Os reativos empregados na revelação¹⁶ têm sido objeto de estudos por parte dos autores na tentativa de se obter sempre maior especificidade para os diferentes grupos funcionais^{11,12,21}.

Apesar de todos estes estudos, o estabelecimento do sistema cromatográfico mais adequado está sempre aberto, dependendo da amostra que se está analisando. Foi nessa direção que conduziu-se este estudo. Procurou-se a melhor forma de extrair os componentes e identificá-los, utilizando-se outras técnicas qualitativas além da cromatografia em camada delgada, apesar dos resultados terem demonstrado que esta é a mais apropriada.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram analisadas 74 amostras de preparações destinadas a regimes de emagrecimento. Estas formulações foram enviadas à Seção de Farmacognosia por consumidores, Órgãos de defesa do consumidor, Serviços de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo (ERSA) e de vários estados do País.

MÉTODOS

As técnicas analíticas empregadas consistiram de análise microscópica, cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região do ultravioleta.

Devido à natureza do material, a análise microscópica, foi efetuada com a intenção de se identificar as drogas vegetais através da comparação dos elementos histológicos das mesmas com padrões existentes na seção. O conteúdo das cápsulas foi descorado utilizando-se solução de hipoclorito de sódio a 5%. Em seguida, as lâminas foram preparadas segundo técnicas preconizadas¹⁴ e observadas ao microscópio.

Como complementação da técnica microscópica, foi utilizada a cromatografia em camada delgada para a identificação de *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada), segundo Wagner²⁴ e diferenciação de outras espécies de *Rhamnus* (ex: *Rhamnus frangula*). A cromatografia foi utilizada também na identificação da *Centella asiática*.

Paralelamente, foram feitas análises de extração para a detecção de benzodiazepínicos e anorexígenos com posterior utilização da cromatografia em camada delgada para a identificação destas substâncias⁷.

PROCEDIMENTOS

Pesquisa de benzodiazepínicos e anorexígenos:

1) Preparo da amostra:

Transfira uma quantidade do conteúdo das cápsulas (cerca de 500 mg) para um béquer, juntamente com 15 ml de solução de ácido clorídrico 3 N. Agite em banho ultrassônico por cinco minutos. Filtre o sobrenadante através de algodão, para funil de separação. Extraia os benzodiazepínicos com três porções de 30 ml de clorofórmio. Filtre o extrato clorofórmico através de sulfato de sódio anidro. Evapore à secura e ressuspensa no mesmo solvente (Extrato 1).

À fase aquosa ácida remanescente no funil de separação adicione solução de hidróxido de amônio a 10% até alcalinização. Efetue a extração dos anorexígenos com três porções de 30 ml de clorofórmio. Filtre o extrato clorofórmico através de sulfato de sódio anidro. Evapore à secura e ressuspensa o resíduo no mesmo solvente (Extrato 2).

Para a extração do mazindol, empregou-se a técnica descrita por ALMEIDA e SZNELWAR¹, extraído-se a amostra com uma mistura de cloreto de metileno + álcool isopropílico na proporção de 9:1. Recolheu-se a fase orgânica e, após a evaporação à secura, ressuspendeu-se o resíduo em metanol.

2) Cromatografia dos extratos:

a) Extrato 1 (benzodiazepínicos) e extrato para a pesquisa de mazindol:

- Fase estacionária: placas de silicagel GF254 (20X20).
- Fase móvel: Acetato de etila: metanol: hidróxido de amônio a 25% (85: 15: 10).
- Desenvolvimento: único, ascendente de 15 cm.
- Padrões: diazepam, lorazepam, bromazepam, oxazepam, clordiazepóxido, mazindol.
- Revelador: reagente de Dragendorff²¹.

b) Extrato 2 (anorexígenos)

- Fase estacionária: placas de silicagel G (20X20).
- Fase móvel: ciclohexano: tolueno: dietilamina (75: 15: 10).
- Desenvolvimento: único, ascendente de 15 cm.
- Padrões: fenproporex, dietilpropiona.
- Revelador: reagente de Dragendorff²¹.

Observação: Preparo do reagente de Dragendorff

Solução a: Dissolva 1,7 g de nitrato básico de bismuto e 20 g de ácido tartárico em 80 ml de água.

Solução b: Dissolva 16 g de iodeto de potássio em 40 ml de água.

Solução estoque: Prepare uma mistura 1:1 das soluções a e b (esta mistura pode ser mantida meses no refrigerador).

Solução de uso: Misture 5 ml da solução estoque a 50 ml de solução de ácido tartárico a 20%.

A comparação do perfil espectrofotométrico da amostra com o padrão de diazepam e outros compostos da família dos benzodiazepínicos foi efetuada dissolvendo-se o resíduo do extrato 1 em hidróxido de sódio 0,1 N. Analogamente, o extrato 2 foi ressuspenso em solução de ácido clorídrico 0,1 n e comparado aos padrões de dietilpropiona e fenproporex.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises de formulações para regimes de emagrecimento com relação à presença de benzodiazepínicos e anorexígenos, declarados ou não nas fórmulas, encontram-se relacionados na Tabela 1. Nesta tabela pode-se observar que das 74 amostras analisadas, somente 34 apresentavam componentes de origem natural. Destas 34 amostras, 17 apresentaram substâncias da portaria 28 (benzodiazepínicos e anorexígenos)⁵. Das 40 amostras que não apresentavam nenhum tipo de componente vegetal, 20 continham as substâncias da portaria 28. Verifica-se ainda que, do total de amostras analisadas, 37 apresentavam as substâncias da portaria 28, das quais 30 continham associações de benzodiazepínicos e anorexígenos, 4 continham benzodiazepínicos e 3 anorexígenos não associados. Na figura 1 são demonstradas as frequências e a natureza das associações entre benzodiazepínicos e anorexígenos.

Em relação à identidade e à frequência dos componentes de origem natural nas formulações analisadas, verificou-se sempre mistura de vários tipos de drogas vegetais numa mesma formulação, sendo que as respectivas predominâncias de utilização estão apresentadas na Figura 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As amostras analisadas foram apresentadas como medicamentos exclusivamente naturais ou então homeopáticos destinados a regimes de emagrecimento. No entanto, em 50% das amostras foram encontradas associações de anorexígenos e benzodiazepínicos, que são substâncias controladas pela portaria 28^{3,4,5}. Em todas elas a presença dessas substâncias era omitida na composição.

Embora 17% das associações encontradas fossem constituídas de diazepam e dietilpropiona e 3% de mazindol e diazepam, foi constatado que a associação mais frequentemente encontrada foi a de diazepam e fenproporex com 80% de frequência.

Isto é explicado pelo fato de tratarem-se de substâncias mais tradicionais e mais baratas, sendo portanto, mais interessantes sob o ponto de vista econômico para as farmácias.

Além da presença destas substâncias houve uma variação dos componentes vegetais. A cáscara sagrada e a frângula, que são espécies do gênero *Rhamnus* com atividade laxativa, estão presentes em 52% das amostras analisadas, seguidas pelo *Fucus* sp, *Cynara* sp (alcachofra), *Spirulina* sp, gelatina, *Centella asiática*, Agar-agar e outros componentes que são usados em menor frequência. Basicamente, a justificativa para seu emprego consiste em associar o efeito laxativo da cáscara sagrada e da frângula com a capacidade de "enchimento do estômago" promovido pelo *Fucus*, algas e carbóximetilcelulose. Estas substâncias tem grande capacidade de absorção de água (aumentando de volume através do entumescimento) resultando numa sensação de plenitude do estômago. O fornecimento de proteínas à dieta se daria através da *Spirulina*, enquanto que o combate à celulite e à flacidez ocorreria por meio da ação da *Centella asiática*. Da mesma forma, outros componentes presentes na formulação, direta ou indiretamente, levariam ao emagrecimento. No entanto, não se tem conhecimento da avaliação da eficácia e nem mesmo da racionalidade destes verdadeiros "coquetéis" de componentes na obtenção do efeito desejado^{9,15}.

Além da identificação das espécies utilizadas nestes medicamentos foi feita uma avaliação macro e microscópica das condições higiênico-sanitárias das amostras.

É importante salientar que embora não tenham sido analisados no presente trabalho, em muitas

TABELA 1
 Presença de anorexígenos e benzodiazepínicos nas formulações estudadas.

PROCEDÊNCIA	COM FÓRMULA DE DROGAS VEGETAIS		SEM FÓRMULA DE DROGAS VEGETAIS		TOTAL
	POSITIVO BDZ + ANOR	NEGATIVO BDZ + ANOR	POSITIVO BDZ + ANOR	NEGATIVO BDZ + ANOR	
USUÁRIO	7	4	12	8	31
SUDS/ERSA	5	8	7	12	32
ÓRGÃOS DECON	3	3	—	—	6
OFICIAIS CVS	2	2	1	—	5
TOTAL	17	17	20	20	74

Figura 1 — Frequência de anorexígenos e benzodiazepínicos nas formulações estudadas.

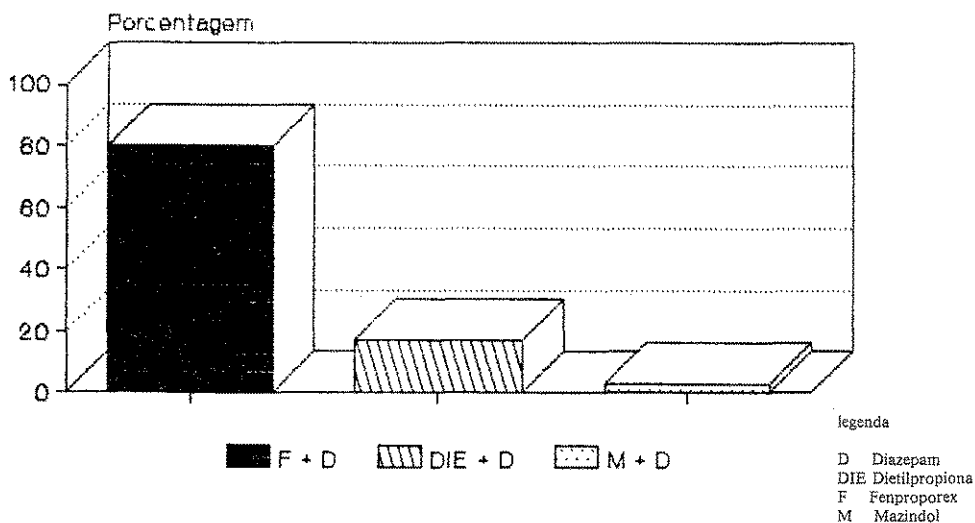
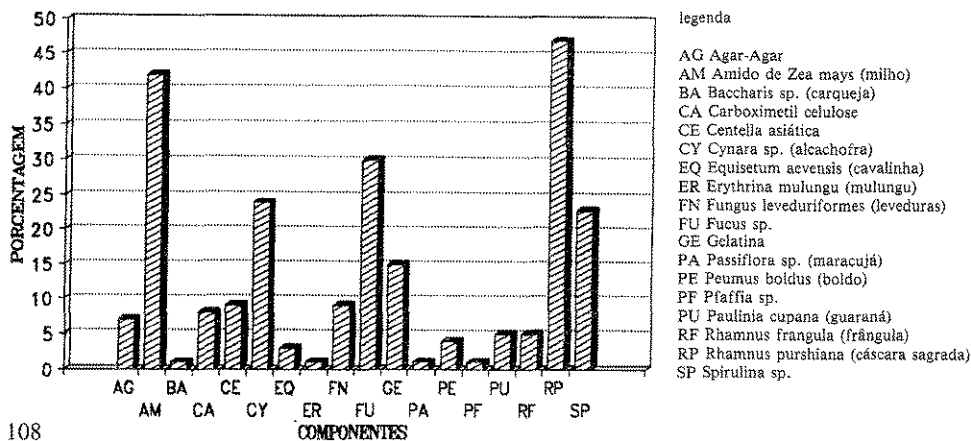


Figura 2 — Frequência de drogas vegetais nas formulações estudadas.



fórmulas era mencionada a presença de hormônios tireoidianos T₃ e T₄.

Além da fraude do emprego de substâncias controladas (diazepam + fenproporex, diazepam + dietilpropiona e diazepam + mazindol) sem declarar na rotulagem, o que constitui uma violação grave da Lei de Vigilância Sanitária, o desconhecimento por parte do usuário da ingestão destas substâncias pode ser muito perigoso. O paciente pode aumentar a dose "terapêutica" por conta própria por acreditar ser um produto natural. Este aumento pode conduzir ao exacerbamento dos efeitos a nível de sistema nervoso central pela ingestão de bebidas alcoólicas, por exemplo. Esta situação pode ser particularmente preocupante quando o consumidor adquire o medicamento diretamente na farmácia e não recebe nenhuma orientação quanto ao seu uso^{6,10,15,19,20,23}.

Observou-se pelas análises das preparações que elas eram, muitas vezes, exatamente iguais em sua composição para várias pessoas, não havendo, portanto, a individualização da prescrição que é a principal característica das formulações magistrais. Ou

tro fato é de que estas formulações também passam por "modismos" que resultam na predominância de determinado componente vegetal conforme a época, como é o caso atualmente da Spirulina. Podem ocorrer casos extremos em que duas amostras que se intitulavam 'Spirulina' eram, na verdade, um produto comercial de liberação prolongada constituído por um anorexígeno associado a um benzodiazepínico, onde a embalagem original e o rótulo haviam sido substituídos.

Do ponto de vista farmacológico, não se conhece até o momento nenhum estudo avaliando a eficácia de tais preparações e mesmo as interações entre os vários componentes da formulação. Do ponto de vista farmacocinético, também não se conhece como ocorre a distribuição no organismo dos princípios ativos passíveis de absorção, assim como a toxicidade.

A falta de tais estudos nos leva a questionar o uso tão difundido destes produtos. É vendida a "idéia mágica" do emagrecimento fácil, sem levar em consideração outros aspectos importantes no combate à obesidade.

RIALA6/718

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & MARKMAN, B.E.O. — Detection of anorectics and benzodiazepines in galenicals used in treatment for obesity. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2): 105-110, 1991.

ABSTRACT: In this study, 74 samples of galenicals used in treatment for obesity were analysed. The authors intended to identify benzodiazepines and anorectics compounds in those formulations. However such compounds are controlled according to regulatory procedures, they have been employed in many formulations without any statement on label. Thin-layer chromatography and UV-spectrophotometry were selected as analytical methods. Botanical species were examined and identified by microscopy and thin-layer chromatography. Benzodiazepines and anorectics substances were found in 50 per cent of the samples.

DESCRIPTORS: galenicals used in treatment for obesity; anorectics, benzodiazepines; detection; thin-layer chromatography; UV-spectrophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M. das G. & Szelwar, R.B.— Identificação do mazindol em urina por cromatografia em camada delgada. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, 20(1):87-93, 1984.
2. BERRY, D. J. & Grove, J.— Emergency toxicological screening for drugs commonly taken in overdose. *J. CHROMATOGR.*, 80:205-19, 1973.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc.— Decreto n.º 79094, de 5 de janeiro de 1977. *Diário Oficial*, Brasília, 07 de janeiro de 1977. Seção ,pt ,p. .Regulamenta a Lei n. 6.360 de 23 de setembro de 1976, que submete ao sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas...
4. BRASIL. Leis, decretos, etc.— Portaria n.º 27 de 24 de outubro de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos. *Diário Oficial*, Brasília, 3 de novembro de 1986. Seção I, pt I, p. 16361-4. Baixa instruções sobre a produção, comercialização, importação, exportação, prescrição e uso de drogas e especialidades capazes de produzirem modificações nas funções nervosas...
5. BRASIL. Leis, decretos, etc.— Portaria n.º 28 de 13 de novembro de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos. *Diário Oficial*, Brasília, 18 de novembro de 1986. Seção I, pt. I, p. 17205-12. Baixa instruções com vistas a normatizar os procedimentos referentes ao controle das atividades correlacionadas a substâncias entorpecentes ou que determinem dependência física ou psíquica.
6. CARLINI, E. A. & MASUR, J.— Venda de medicamentos sem receita médica nas farmácias da cidade de São Paulo. *Rev. Assoc. med. bras.*, 32(5/6):75-8, 1986.

7. CLARKE, E. G. C., ed. *Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*. London, Pharmaceutical Press, c1969. p. 4-11, 43-9, 294, 301.
8. FIKE, W. W.— Structure- R_f correlations in the thin-layer chromatography of some basic drugs. *Anal. Chem.*, 38(12):1967-702, 1966.
9. FUCKS, F. D.— O médico e a questão dos medicamentos: uma análise crítica sobre os fundamentos da prescrição de fármacos. *Ciênc. Cult.*, 40(7):652-5, 1988.
10. JUAREZ, E.— Automedicação: de novo um velho problema. (Editorial). *Rev. Assoc. med. bras.*, 32(5/6):73-4, 1986.
11. KAISTHA, K. K., TADRUS, R. & JANDA, R.— Simultaneous detection of a wide variety of commonly abused in a urine screening program using thin-layer identification techniques. *J. Chromatogr.*, 107:359-79, 1975.
12. MACEK, K., ed. *Pharmaceutical applications of thin-layer and paper chromatography*. Amsterdam, Elsevier, 1972, p. 228-35.
13. MORAES, E. de C. F. & SZNELWAR, R. B.— Identificação de fármacos de caráter ácido e neutro por cromatografia em camada delgada. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, 23(2):142-51, 1987.
14. OLIVEIRA, F. & AKISUE, G.— *Farmacobotânica: curso de identificação de drogas vegetais*. São Paulo, s.c.p. 1981. 3 v.
15. ROZENFELD, S.— O uso de medicamentos no Brasil. In: RAMON-LAPORTE, J., TOGNONI, G. & ROZENFELD, S. *Epidemiologia do medicamento: princípios gerais*; trad. por Margaret de F. Rodrigues e Vera Lúcia E. Pepe. São Paulo, HUCITEC, 1989. cap. 1, p. 21-41.
16. RUBIA, L. B. & GOMEZ, R.— TLC sensitivity of six modifications of Dragendoff's reagent. *J. Pharm. Sci.*, 66(11):1656-7, 1977.
17. SCHENKEL, E. P., SIMÕES, C. M. O., MENGUE, S. S., MENTZ, L. A., IRGANG, B. E. & STEHMANN, J. R.— O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Cad. Farm.*, Porto Alegre, 1(2):65-72, 1985.
18. SILVA, A. F., KOEHLIN, B. A. & BADER, G.— Blood level distribution patterns of diazepam and its major metabolite in man. *J. Pharm. Sci.*, 55(7):692-702, 1966.
19. SIMÕES, M. J. S. & FARACHE FILHO, A.— Consumo de medicamentos em região do estado de São Paulo (Brasil), 1985. *Rev. Saúde pública*, São Paulo, 22(6):494-9, 1988.
20. SOIBELMAN, M., AMARAL, L. R., PALMINI, A. L. F., LERRER, D. P. & LEITE, S. S.— Indicação de medicamentos por balconistas de farmácia em Porto Alegre-RS. *Rev. Assoc. med. bras.*, 32(5/6):79-83, 1986.
21. STAHL, E., ed. *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook*; translated: by M.R.F. Ashworth. 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag, 1969. p. 507-49.
22. STEAD, A. H., GILL, R., WRIGHT, T., GIBBS, J. P. & MOFFAT, A. C.— Standardised thin-layer chromatographic systems for the identification of drugs and poisons. *Analyst*, 107:1106-68, 1982.
23. TANCREDI, F. B.— Consumo de medicamentos benzodiazepínicos no Brasil — 1970 a 1985: estudo comparativo de tendências. Tese de doutoramento — Faculdade de Saúde Pública da USP.
24. WAGNER, H., BLADT, S. & ZGAINSKI, E. M.— *Plant drug analysis*. Berlin, Springer-Verlag, 1984. p. 104.
25. WOULTERS, I., ROETS, E. & HOOGMATENS, J.— Thin-layer chromatographic identification on nineteen benzodiazepine derivatives. *J. Chromatogr.*, 17:381-89, 1979.

Recebido para publicação em 2 de julho de 1991.