



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

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN0073-9855

RIALA 6

VOLUME 54

NÚMERO 2

1994



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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

DIRETOR RESPONSÁVEL

LILIAN MARIA DE CASTILHO
Diretora Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSÉ EDUARDO TOLEZANO, Presidente
CARMO ELIAS ANDRADE MELLES
JÚLIA MARIA MARTINS DE SOUZA FELIPPE
DILMA SCALA GELLI
HEIDI PINTO MARTINS
ALICE MOMOYO ATA SAKUNA
PAULO TIGLEA

Endereço/address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 — Caixa Postal 7027
01246-902 — São Paulo, SP - Brasil

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

(*)

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

1941 — 1993, 1-53

1994, 54 (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.

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 54(2): 69-130, JUN./DEZ., 1994.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos

- 764 Avaliação de parâmetros físicos e químicos no estudo da adulteração do azeite de oliva.
Evaluation of olive oil adulteration by physical and chemical parameters.
AUED-PIMENTEL, S., MANCINI-FILHO, J.; BADOLATO, E.S.G. & CARVALHO, J.B... 69-77
- 765 Estudo microbiológico de queijo tipo minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto.
Microbiological study of Brazilian Minas cheese of manual facturing commercialized at São José do Rio Preto (SP) City.
GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMAN, F.L. & VINTURIM, T.M..... 78-82
- 766 Estudo morfológico da anemia em idosos.
The morphological study of anemia in ederly.
MIYAMARU YOKOMIZO, R.; YANG, H.M.; CANGERANA, F.A.; GUSHIKEN, E.Y.;
NIERO, L.I. & MUNHOZ, M.A.G. 83-7
- 767 Bactérias do gênero *Haemophilus* isoladas de sangue, na Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz no período de 1979 a 1991.
Bacteria of the genus *Haemophilus* isolated from blood in the Section of Bacteriology, Instituto Adolfo Lutz in the period of 1979 to 1991.
VIEIRA, M.F.P.; MEZZACAPA NETO, B.; LANDGRAF, I.M.; BUSCHINELLI, S.S.O.;
TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. 88-92
- 768 Uso de tamis na identificação de elementos histológicos em iogurtes com polpa de fruta(s).
The hystological identification in yogurts containing fruit pulp by using sieve USBS 230.
NOGUEIRA, M.D. & RODRIGUES, R.M.M. 93-6
- 769 Controle de esterilidade de soluções parenteais de grande volume utilizadas na rede hospitalar da cidade de São Paulo.
Control of sterility in great volume parenteral solutions used in hospitals in the city of São Paulo.
NOVO, O.F. & AURICCHIO, M.T. 97-101
- 770 Metodologias para controle da adequação de embalagens para água mineral.
Mineral water packaging: quality control and methodology avaluation.
MURATA, L.T.F.; NUNES, M,C,D.; ALCÂNTARA, M.R.S.; PASCUET, N.S. & MINAS,
V.H.M. 102-106
- 771 Avaliação do valor calórico de chocolates dietéticos.
Caloric value of dietetic chocolate evaluation.
ABREU, R.W.; OLIVEIRA, I.R. & ZENEBRON, O. 107-9

772	As serralhas do Brasil: <i>Emilia sonchifolia</i> L., <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill e <i>Taraxacum officinale</i> Weber - exame microscópico comparativo. The serralhas of Brasil: <i>Emilia sonchifolia</i> L., <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill e <i>Taraxacum officinale</i> Weber - compared microscopic examination. RIALA / JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & OLIVEIRA, I.	110-4
773	A importância do diagnóstico e do estudo familiar na anomalia de Pelger-Huët. The importance of the diagnostic and the family study of the Pelger-Huët anomaly. KITAMURA, C.; CAGERANA, F.A.; YOKOMIZO, R.M.; GUSHIKEN, E.Y. NIERO, L.I. & MUNHOZ, M.A.G.	115-20
774	Influência do controle glicêmico na hiperlipemia de mulheres diabéticas (tipo II). Influence of hyperlipidemia in diabetics women (type II). MARTINS, H.P.; ODA, M.Y.N.; ZAMBONI, I.M.; CASTILHO, L.N.	121-5
775	Teor de nitrato e nitrito em vegetais cultivados no distrito federal. um estudo preliminar. Nitrate and nitrite in vegetable cultivated at Distrito Federal: preliminary study. RATH, S.; XIMENES, M.I.N.; REYES, F.G.R.	126-30

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

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

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

Página de rosto

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

Texto

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

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

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

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

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

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

Na ausência de um dado numérico, empregar os seguintes sinais convencionais:

- quando, pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
- Z quando o dado for rigorosamente zero;
- ... quando não se dispuser do dado;
- 0,0 quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.;
- X quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

ILUSTRAÇÕES (fotografias, gráficos, desenhos, mapas, etc.) — Serão designadas no texto como "figuras": terão numeração única e seguida, em algarismos arábicos.

Todas as ilustrações deverão ser identificadas com: número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; deverão ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade; as respectivas legendas deverão estar escritas fora da área de reprodução.

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

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

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

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

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

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

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

Para artigos periódicos

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

Ex.:

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

Para livros

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

Ex.:

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor - alterações do original. Este original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de recebimento, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.

6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 50 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, na conformidade da legislação sobre Direitos Autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

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

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS NO ESTUDO DA ADULTERAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA

Sabria AUED-PIMENTEL*
Jorge MANCINI FILHO**
Elza Schwarz Gastaldo BADOLATO*
José Byron de CARVALHO*

RIALA6/764

AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J.; BADOLATO, E.S.G. & CARVALHO, J.B. -
Avaliação de parâmetros físicos e químicos no estudo da adulteração do azeite de
oliva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 69-77, 1994.

RESUMO: Foram estudados 15 parâmetros físico-químicos do azeite de oliva virgem de boa qualidade, e de misturas deste, em diferentes proporções, com óleo de soja, visando avaliar algumas características de identidade e qualidade. Determinou-se os principais ácidos graxos, índices de iodo e refração, esqualeno, extinções específicas a 232 e 270 nm, acidez (em ácido oléico), índice de peróxido, a relação entre as porcentagens do ácido oléico e linoléico (O/Li) e um parâmetro obtido do espectro derivado de 2ª ordem no ultravioleta ($\Delta K1\%/1\text{cm}$ 310-313 nm). Através da análise estatística, verificou-se elevado grau de correlação entre os parâmetros estudados, assim como uma relação linear entre a maioria destes e a concentração do adulterante. O índice de refração e a porcentagem de ácido linoléico, considerando os limites previstos no "Codex Alimentarius", mostraram-se os mais sensíveis na avaliação da adulteração do azeite de oliva com óleo de soja. Estas determinações, isoladamente, mostraram-se mais eficientes do que a avaliação feita pela análise estatística em componentes principais, dos subconjuntos dos 15 parâmetros estudados. Avaliação da relação O/Li revelou que este parâmetro pode ser utilizado apenas como indicativo da adulteração do azeite de oliva com outros óleos vegetais, devido a grande faixa de variação destes ácidos graxos.

DESCRIPTORIOS: Azeite de oliva; adulteração do azeite de oliva.

INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é um óleo vegetal comestível que apresenta elevado preço de mercado em função de suas características sensoriais altamente atrativas ao consumidor e da produção limitada^{22,23}. Este óleo é um dos únicos, dentre os óleos vegetais, que é consumido sem tratamentos industriais de refino^{16,21}.

No Brasil todo o azeite consumido é importado da Argentina ou da Europa⁶. Nem todo o azeite consumido no mundo, entretanto, é de boa qualidade. Grandes quantidades deste óleo são submetidas a tratamento de refino, principalmente por originarem-se de olivas de

baixa qualidade, isto é, fermentadas ou infectadas. O processo de refino, conseqüentemente, destrói os atributos sensoriais do azeite, os quais são os principais responsáveis pela qualidade deste óleo²¹.

O elevado valor de mercado do azeite de oliva favorece certas práticas fraudulentas, que visam a obtenção de maiores lucros por parte dos produtores ou enlatadores^{3,5,14,15,24,29}.

O azeite de oliva tem sido alvo de diversos tipos de adulterações, isto é, com outros óleos vegetais de baixo valor comercial^{13,5,24,29}, com azeite de oliva refinado, obtido de frutos avariados ou da extração

* Do Instituto Adolfo Lutz - Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos e Laboratório de Cromatografia em fase gasosa.

** Da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

com solventes da torta residual de prensagem das olivas^{8,14,15}, ou mesmo com óleo reesterificado, sintetizado em laboratório^{14,15}.

No Brasil, o principal tipo de fraude é feita pela adição de óleos vegetais de baixo valor comercial^{3,13,24,25,29}, principalmente com óleo de soja, devido a sua produção em larga escala com preços inferiores aos demais óleos vegetais^{24,29}.

O estudo de novos parâmetros e correlações entre os índices físico-químicos do azeite de oliva e de outros óleos vegetais, através de técnicas analíticas mais avançadas^{17,19,20,28} e a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos na seleção e avaliação dos parâmetros mais característicos de cada óleo vegetal^{1,2,6,26,27}, têm levado à identificação de componentes que permitam as devidas caracterizações dos óleos vegetais e que mostrem-se mais sensíveis na avaliação de adulterações. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo verificar alguns parâmetros de identidade do azeite de oliva que podem ser utilizados na avaliação de adulterações especialmente com óleo de soja, empregando técnicas de análise estatística para analisar o grau de discriminação dos parâmetros isolados ou em conjunto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Amostras de Azeites de Oliva

Foram selecionadas 24 amostras de azeites de oliva de diferentes marcas comercializadas na cidade de São Paulo, durante os anos de 1989 a 1990, adquiridas no comércio ou colhidas por órgãos governamentais de defesa do consumidor e encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz, sendo:

- 16 amostras de procedência Argentina
- 08 amostras procedentes de diferentes países da Europa

Amostras de óleos de soja

Foram analisadas e selecionadas 10 amostras de óleos de soja comestíveis de diferentes marcas, obtidas do comércio da cidade de São Paulo.

Misturas preparadas

Foram elaboradas misturas binárias, a partir de um azeite de oliva "virgem" argentino, selecionado, e de um óleo de soja brasileiro adquirido no comércio da cidade de São Paulo.

- misturas binárias - óleo de oliva adicionado de : 2,5,10,15,20,30,40,50,70,80,85 e 90% de óleo de soja (v/v).

Métodos

As determinações do índice de refração a 40°C, da acidez em de ácido oléico, do índice de peróxidos e do teor de esqualeno seguiram as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁸.

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia em fase gasosa, sendo a transesterificação, o processo empregado na metilação, segundo descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁸. Utilizou-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama, marca CG, modelo 500, acoplado a um integrador.

Os componentes foram separados em coluna capilar, de sílica fundida, de 25m, Carbowax 20M.

Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada da coluna: 100 a 220 °C; temperatura do injetor, 230°C; temperatura do detector, 240°C; gás de arraste, hidrogênio (fluxo, 0,8 ml/min.); razão de divisão da amostra, 1:100. A identificação dos ácidos graxos foi feita através de padrões de ésteres metílicos dos ácidos graxos, puros, e a quantificação por normalização de área.

O índice de iodo foi calculado a partir das porcentagens relativas obtidas para os ácidos graxos insaturados (normalização de área), segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Iodo} = (\% \text{ ácido palmitoléico} \times 0.95) + (\% \text{ ácido oléico} \times 0.86) + (\% \text{ ácido linoléico} \times 1.732) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2.616)^7.$$

A medida das extinções específicas, no espectro ultravioleta, a 232 e 270 nm, seguiu a metodologia descrita na norma internacional recomendada para o azeite de oliva pela Comissão do Codex Alimentarius¹⁰. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de simples feixe, marca Bausch Lomb, modelo Spectronic, com cubetas de quartzo de 1 cm nas soluções do óleo em ciclohexano, isto é: 1% (p/v) e 0,2% (p/v) a 270 e 232 nm, respectivamente.

Para determinar a derivada de 2ª ordem dos espectros no ultravioleta dos óleos vegetais e obter o parâmetro ΔK 1%/1cm 310-313 nm, destes espectros, seguiu-se metodologia descrita por AUED-PIMENTEL e colaboradores⁴.

Análise Estatística *Análise descritiva*

Foi empregada a técnica da análise descritiva dos dados obtidos para os 15 parâmetros das amostras puras de azeite de oliva, de óleo de soja e suas misturas.

Foi realizada a análise gráfica e foram feitas medidas descritivas dos parâmetros visando verificar o comportamento de cada um frente a adulteração¹¹.

Análise em componentes principais

Empregou-se a técnica de análise em componentes principais para trabalhar com combinações dos parâmetros originais, e verificar como eles se comportam na avaliação de adulteração do azeite de oliva com óleo de soja²⁸. Através desta técnica a dimensão do conjunto de dados é reduzida pela construção de um novo conjunto de parâmetros, não correlacionados, que contenham toda a variabilidade do conjunto original¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 1 e 2, encontram-se os resultados obtidos das determinações de 15 parâmetros de um

azeite de oliva virgem, Argentino, de um óleo de soja brasileiro e de suas misturas.

Com os dados obtidos foi feito um estudo estatístico para avaliar o grau de discriminação dos parâmetros, ou conjunto de parâmetros, frente a adulteração do azeite de oliva com óleo de soja.

Os valores apresentados nas tabelas 1 e 2 são as médias de triplicatas para cada parâmetro. A precisão dos dados pode ser observada na FIGURA 1, gráficos de a o, onde todos os pontos originais foram plotados.

Os gráficos foram construídos para cada um dos 15 parâmetros, tendo na ordenada a média dos valores das triplicatas, e na abscissa a porcentagem de óleo de soja adicionado ao azeite de oliva.

TABELA 1

Características físico-químicas de amostras de óleo de oliva argentino, óleo de soja brasileiro e suas misturas

Determinações Óleo	% ácido palmítico C16	% ácido palmitoléico (C16:1)	% ácido esteárico (C18)	% ácido oléico (C18:1)	% ácido linoléico (C18:2)	% ácido linoléico (C18:3)	O/Li % ácido oléico % ácido linoléico
Oliva puro Argentino	13,5	1,4	2,1	70,7	11,8	0,6	6,01
Soja puro Brasileiro	11,7	-	3,2	20,9	56,6	7,6	0,37
Oliva - 98% Soja - 2%	13,5	1,2	2,5	69,6	12,4	0,8	5,59
Oliva - 95% Soja - 5%	13,5	1,2	2,6	68,3	13,4	0,9	5,09
Oliva - 90% Soja - 10%	13,5	1,4	2,2	64,4	16,8	1,7	3,83
Oliva - 85% Soja - 15%	13,4	1,2	2,7	61,4	19,4	1,8	3,16
Oliva - 80% Soja - 20%	13,5	1,0	2,5	60,6	20,6	1,9	2,95
Oliva - 70% Soja - 30%	12,9	0,8	2,4	55,6	25,6	2,7	2,17
Oliva - 60% Soja - 40%	12,9	0,7	2,4	50,7	30,2	3,2	1,68
Oliva - 50% Soja - 50%	12,9	0,7	2,6	44,3	35,3	4,1	1,25
Oliva - 30% Soja - 70%	12,4	-	2,8	38,5	43,3	5,9	0,82
Oliva - 20% Soja - 80%	11,9	-	3,1	31,7	46,7	6,6	0,68
Oliva - 15% Soja - 85%	12,0	-	3,0	27,7	50,9	6,4	0,54
Oliva - 10% Soja - 90%	12,0	-	3,0	25,2	53,1	6,7	0,47

TABELA 2

Características físico-químicas de amostras de óleo de oliva argentino, óleo de soja brasileiro e suas misturas

Determinações Óleo	Índice de iodo*	Índice de refração (à 40°)	Acidez (em ácido oléico)	Índice de peróxidos**	Esqualeno***	E _{1cm} ^{1%} 270nm	E _{1cm} ^{0.2%} 232nm	Δk _{1cm} ^{1%} 310-313 nm Abs.	h(as)
Oliva puro Argentino	84	1,4622	0,74	13,40	463	0,16	0,44	0,0005	6
Soja puro Brasileiro	136	1,4678	0,14	1,11	9	1,10	0,50	0,0043	55
Oliva - 98% Soja - 2%	85	1,4621	0,72	14,63	474	0,18	0,42	0,0005	7
Oliva - 95% Soja - 5%	86	1,4624	0,70	14,44	456	0,21	0,43	0,0007	9
Oliva - 90% Soja - 10%	90	1,4628	0,68	12,72	409	0,25	0,44	0,0010	12
Oliva - 85% Soja - 15%	92	1,4631	0,69	11,77	406	0,31	0,46	0,0011	14
Oliva - 80% Soja - 20%	93	1,4634	0,60	11,02	388	0,36	0,43	0,0013	18
Oliva - 70% Soja - 30%	100	1,4640	0,55	10,43	333	0,45	0,45	0,0017	21
Oliva - 60% Soja - 40%	105	1,4644	0,50	8,77	282	0,55	0,44	0,0021	26
Oliva - 50% Soja - 50%	111	1,4650	0,42	7,30	248	0,63	0,43	0,0024	32
Oliva - 30% Soja - 70%	121	1,4661	0,32	5,43	141	0,82	0,46	0,0033	45
Oliva - 20% Soja - 80%	125	1,4667	0,27	4,44	98	0,91	0,46	0,0039	48
Oliva - 15% Soja - 85%	129	1,4670	0,25	3,18	57	0,97	0,47	0,0041	51
Oliva - 10% Soja - 90%	131	1,4673	0,18	2,63	53	1,02	0,49	0,0042	53

* Calculado pela fórmula: (0,95 x % ac. palmitoléico) + (0,86 x % ac. oléico) + (1,732 x % ac. linoléico) + (2,616 x % ac. linolênico).

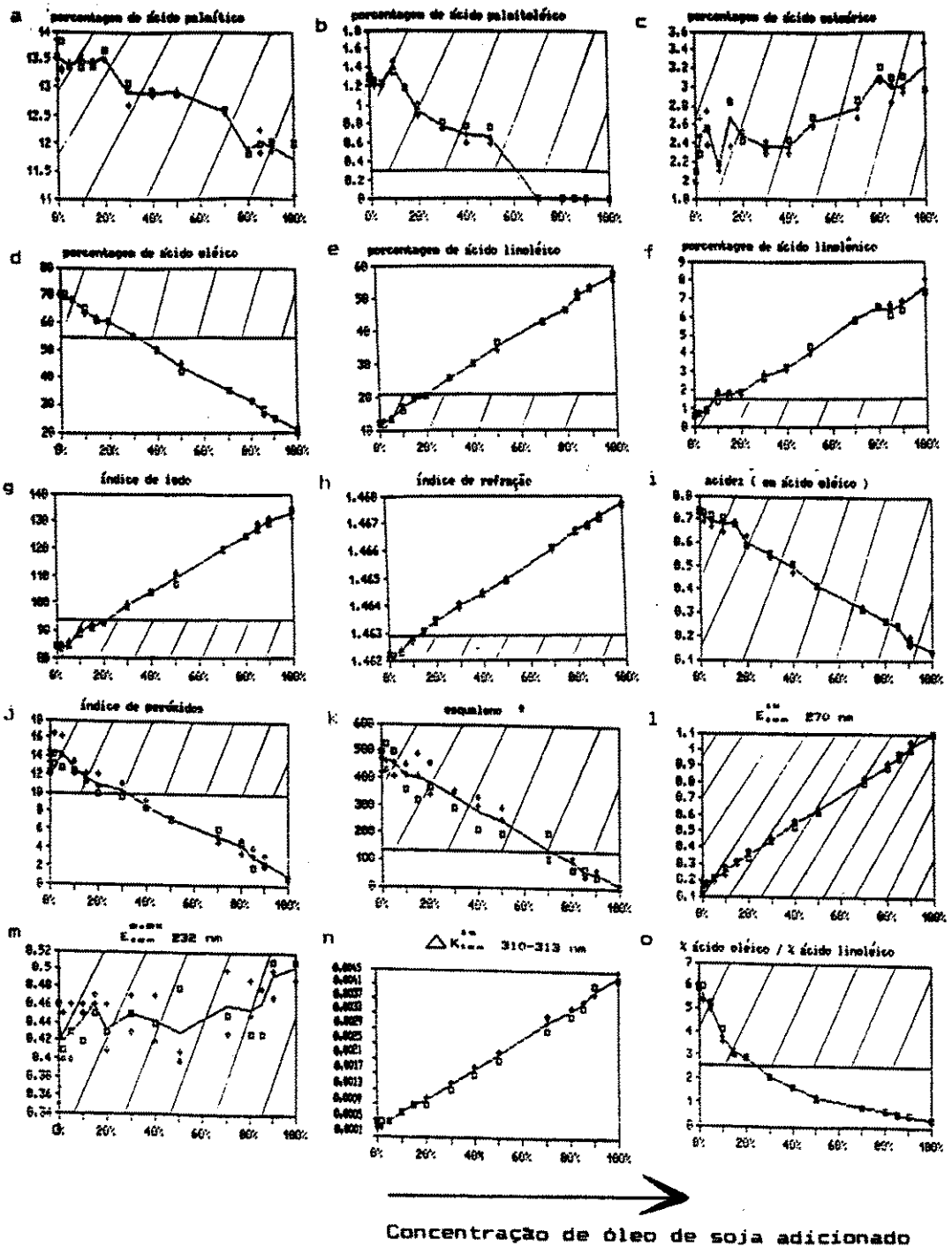
** miliequiv/kg

*** (mg/100g)

Nos gráficos foram colocadas faixas (região hachurada) de acordo com os limites estabelecidos pelo "Codex Alimentarius" (Tabela 3), para o azeite de oliva virgem puro ou de acordo com a literatura, quando não previsto por aquele órgão. Estes limites foram utilizados como critério de avaliação da adulteração. Para o parâmetro ΔK 1%/1cm 310-313 nm não há faixas estabelecidas por tratar-se de um parâmetro novo, sendo que em outro trabalho⁴ dedicamos um estudo mais aprofundado para avaliar sua

extensão de variação, entretanto ainda não está estabelecida. Portanto a avaliação deste parâmetro, no presente trabalho, tem caráter ilustrativo.

Neste estudo deu-se maior ênfase aos principais parâmetros de identidade, para se avaliar qual ou quais poderiam indicar com maior sensibilidade a adulteração do azeite de oliva, entretanto, não foi feita uma amostragem ampla para se verificar a real variabilidade dos parâmetros.



limites estabelecidos pela Comissão do Codex Alimentarius 9 para o azeite de oliva.

(*) A faixa de variação do teor de esqualeno para o azeite de oliva (área achurada), foi obtida da literatura, visto que não há previsão deste parâmetro nas normas estabelecidas pelo Codex Alimentarius.

FIGURA I

Estudo do comportamento gráfico dos parâmetros físico-químicos do azeite de oliva frente a adição de diferentes concentrações de óleo de soja

TABELA 3

Características físico-químicas dos óleos de oliva segundo a Comissão do Codex Alimentarius⁹

Parâmetros	Faixa de variação
% ácido palmítico	7,5 - 20,0
% ácido palmitoléico	0,3 - 3,5
% ácido esteárico	0,5 - 5,0
% ácido oléico	55 - 85
% ácido linoléico	3,5 - 21
% ácido linolênico	< 1,5
Índice de iodo	75 - 94
Acidez (%) (em ácido oléico)	< 3,3
Índice de refração a 40°C	1,4601 - 1,4629
Índice de peróxidos(miliequiv/kg)	< 20
Esqualeno (*) (mg/100g)	125 - 750
$E_{1cm}^{1\%232nm}$ (**)	< 3,5
$E_{1cm}^{1\%270nm}$	< 1,10

(*) A faixa de variação do teor de esqualeno para o azeite de oliva, foi obtida da literatura⁹, pois não são previstos limites para este parâmetro nos padrões estabelecidos pelo Codex Alimentarius.

(**) A leitura 232 nm foi realizada com solução a 0,2% do óleo em ciclohexano, portanto, para comparação com a tabela acima deve-se multiplicar o valor obtido por 5.

TABELA 4

Porcentagem mínima de detecção da adulteração do azeite de oliva com óleo de soja para cada parâmetro

10%	porcentagem de ácido linolênico e índice de refração
20%	porcentagem de ácido linoléico, índice de iodo, % ácido oléico / % ácido linoléico (O/Li)
30%	porcentagem de ácido oléico, índice de peróxidos
60%	porcentagem de ácido palmitoléico
80%	esqualeno
não detectada	porcentagem de ácido palmítico, porcentagem de ácido esteárico, acidez (em ácido oléico), $E_{1cm}^{1\%270nm}$ e $E_{1cm}^{0,2\%232nm}$

Observação: O parâmetro $\Delta k_{400}^{1\%}$ 310-313 nm não aparece na listagem, uma vez que não está classificado no Codex.

A maioria dos parâmetros estudados apresentam comportamento linear bem definido com a adulteração (Figura 1). Os parâmetros: porcentagens dos ácidos palmítico, palmitoléico e esteárico e EO, 2%/1cm 232 nm, não apresentaram um comportamento padrão definido com a adição do adulterante e a relação O/Li, apresentou um decréscimo não linear com a adulteração.

TABELA 5

Resposta da análise em componentes principais dos conjuntos de parâmetros frente a adulteração

Variáveis	Primeira componente explica	R ² regressão explica
1. Todas as variáveis originais	94%	0,998
2. $\Delta k_{400}^{1\%}$ 310-313 nm e % oléico / % ácido linoléico (O/Li)	96%	0,985
3. Todas exceto % ácido oléico, % ácido linoléico, índice de iodo, índice de refração e esqualeno	91%	0,994
4. % ácido linolênico e índice de refração	99%	0,999

Observou-se para o parâmetro esqualeno (figura 1k), maior dispersão dos valores em torno das médias, isto devido a pouco precisão da metodologia empregada¹⁸. Esta dispersão também foi observada para os valores do índice de peróxidos (Figura 1 J), isto devido a instabilidade daqueles compostos, formados na autoxidação dos óleos.

Para o experimento em estudo, comparando os limites do Codex, ou retirados da literatura, com os valores obtidos experimentalmente, nos diferentes graus de adulteração, pôde-se estabelecer quais as porcentagens mínimas de adulteração são detectadas a partir de cada parâmetro (Tabela 4). Dentre os parâmetros estudados os que melhor discriminaram a adulteração foram: porcentagem do ácido linolênico e o índice de refração, chegando a 10% o limite de detecção do óleo de soja no azeite de oliva.

Os resultados obtidos, entretanto, devem ser avaliados com cuidado pois neste experimento empregou-se um modelo simplificado, composto de apenas uma amostra de azeite de oliva argentino, e portanto não foi possível avaliar a variabilidade real de cada parâmetro. Se aplicássemos tal procedimento em um banco de dados dos parâmetros de azeite de oliva de diversas variedades e procedências geográficas, provavelmente, obteríamos curvas em função da adulteração com diferentes inclinações e outros limites de detecção para muitos dos parâmetros. Por exemplo, considerando os valores médios do teor do ácido linolênico, encontrados nos azeites argentinos e europeus, comercializados no Brasil, e nos óleos de soja brasileiros (Tabela 6), a detecção de 10% de óleo de soja no azeite de oliva, através daqueles parâmetros, seria um valor possível de ser verificado. Entretanto, considerando a ampla faixa de variação prevista para o teor de ácido linolênico nos óleos em estudo^{9,10}, especialmente para os valores extremos, 10% de detecção da adulteração seria um resultado com pouca confiabilidade.

TABELA 6

Características físico-químicas de azeites de oliva argentinos e europeus e de óleos de soja brasileiros

Determinações	% ácido palmítico (C16)	% ácido palmitoléico (C16:1)	% ácido esteárico (C18)	% ácido oléico (C18:1)	% ácido linoléico (C18:2)	% ácido linolênico (C18:3)	O/Li % ácido oléico % ácido linoléico
Azeites Argentinos (16 amostras)	14,2 ± 3,1	1,5 ± 0,6	2,5 ± 0,6	67,8 ± 6,8	13,2 ± 4,5	0,9 ± 0,2	6,2 ± 3,8
Azeites Europeus (8 amostras)	11,5 ± 1,7	1,1 ± 0,5	2,7 ± 0,8	72,9 ± 4,7	10,7 ± 3,0	1,0 ± 0,3	7,4 ± 2,4
Soja (10 amostras)	14,5 ± 0,4	-	3,1 ± 0,5	21,5 ± 1,6	56,7 ± 1,7	7,3 ± 0,7	0,38 ± 0,04

* Média ± Desvio padrão.

As mesmas considerações acima devem ser feitas para o índice de refração, uma vez que apresenta as mesmas limitações que o parâmetro porcentagem de ácido linolênico.

Para o parâmetro O/Li (relação entre as porcentagens de ácido oléico e linoléico), pela comparação dos valores obtidos para os azeites de oliva e para os óleos de soja avaliados, notamos grandes diferenças (Tabela 6) isto é, o azeite de oliva apresenta valores bem maiores daquele relação. Entretanto, considerando os limites extremos previstos no Codex Alimentarius para aqueles ácidos graxos no azeite de oliva (Tabela 3), a relação O/Li pode assumir valores baixos. Desta forma, a ampla faixa de variação daquela relação, para o azeite de oliva, não permite que a adulteração seja detectada em baixos níveis, como foi observado no estudo com óleo de soja, cujo limite de detecção observado foi 20%. A não linearidade do parâmetro O/Li com a adulteração, é outro fator que dificulta sua utilização na previsão dos níveis de adulteração detectáveis.

Pela aplicação da técnica estatística de componentes principais, vários subconjuntos dos 15 parâmetros foram avaliados para verificar o comportamento com relação a adulteração. A tabela 5, mostra a porcentagem de variabilidade explicada pela primeira componente principal em cada subconjunto testado, bem como o correspondente coeficiente de explicação da regressão da componente contra o grau de adulteração. A 1ª componente foi suficiente para explicar mais de 90% da variabilidade dos dados.

Os resultados da análise em componentes principais revelaram que tal técnica não se mostrou mais

eficiente do que os parâmetros utilizados individualmente na avaliação da adulteração como: porcentagem do ácido linolênico e índice de refração.

CONCLUSÕES

Pela análise estatística descritiva dos parâmetros obtidos do azeite de oliva puro e das misturas com óleo de soja, verificou-se que a maioria apresentou relação linear com a adulteração, sendo que a porcentagem de ácido linolênico e o índice de refração foram os que apresentaram maior sensibilidade para discriminar a adulteração.

A aplicação da análise estatística em componentes principais, não se mostrou mais eficiente na avaliação da adulteração do que alguns parâmetros utilizados individualmente, como: a porcentagem de ácido linolênico ou o índice de refração.

A avaliação da relação O/Li (porcentagem de ácido oléico pela de ácido linoléico) revelou que este parâmetro pode ser utilizado apenas como indicativo da adulteração do azeite de oliva com óleo de soja devido a grande variabilidade destes ácidos graxos.

Devido a ampla faixa de variação prevista para o teor de ácido linolênico e índice de refração nos óleos vegetais, o limite de detecção de 10% observado em nosso estudo apresentou pequena confiabilidade. Possivelmente a determinação de outros parâmetros dos óleos vegetais como: triglicerídeos, esteróis, hidrocarbonetos, entre outros, levariam a níveis inferiores a 10% de detecção da adulteração.

RIALA6/764

AUED-PIMENTEL, S., MANCINI-FILHO, J.; BADOLATO, E.S.G. & CARVALHO, J.B. - Evaluation of olive oil adulteration by physical and chemical parameters. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 69-77, 1994.

ABSTRACT: In order to evaluate olive oil identity and quality characteristics fifteen analytical parameters from virgin olive oil and from its different mixtures with soybean oil, were studied. The principal fatty acids composition, iodine value, refractive index, esqualene contents, specific extinctions at 232 and 270 nm, acidity, peroxides index, the ratio of oleic to linoleic acids (O/Li) and a parameter from second derivative ultraviolet spectra (ΔK 1%/1cm 310 - 313 nm), were determined. The data were statistically treated by descriptive and principal component analysis techniques. Most of the parameters studied showed high correlation among them, as well as, a linear behaviour with adulteration level increase. The refractive index and linolenic acid contents showed to be the most sensitive parameters to discriminate olive oil adulteration with soybean oil, agreeing with the acceptable ranges given by Codex Alimentarius. Principal component analysis of parameters sets studied, were not more efficient than some individual parameters to evaluate adulteration. The evaluation of the ratio O/Li showed that this parameter can be utilized only as an indicator of olive oil adulteration, due to the variability of these fatty acids in vegetable oils.

DESCRIPTORS: olive oil; olive oil adulteration.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APARICIO, R.; ALBI, T.; LANZON, A.; NAVAS, M.A. - SEXIA, um sistema experto para la identificación de aceites: base de datos de zonas olivares. *Grasas y aceites, Sevilla*, 38(1):9-14, 1987.
2. APARICIO, R.; FERREIRO, L.; CERT, A.; LAZON, A. - Caracterización de aceites de oliva virgenes andaluces. *Grasas y Aceites, Sevilla*, 41(1): 23-39, 1990.
3. AUED, S. - Adulteração de azeite de oliva. *Bol. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 1(1):8, 1991.
4. AUED-PIMENTEL, S.; ALMEIDA-GONÇALVES, M.L.; MANCINI-FILHO, J. - Aplicação da espectrofotometria derivada na avaliação da qualidade do azeite de oliva. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 13(2):121-31, 1993.
5. BADOLATO, E.S.G.; DURANTE, F.; ALMEIDA, M.E.W.Z.; SILVEIRA, N.V.V. - Óleo de oliva - avaliação de sua qualidade. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 41(1):63-70, 1981.
6. BANCO DO BRASIL. CACEX/DEPEC. Importação de mercadoria. País/porto. Jan./maio 1990 (EC1-780 - Microficha).
7. CALCULATED iodine value. In: AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY - Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society 4th ed. Champaign, IL, A.O.C.S., 1989. (Official Method Cd 1c-85).
8. CHOUKROUN, M.; FAYE, D.; MARTEAU, M.; SOLERE, M.; SUDRAUD, D.; SUDRAUD, G.; VERETOUT, O. - Note sur la recherche de l'adulteration des huiles d'olive par les huiles de grignons d'olive. *Rev. Fr. Corps. Gras.*, Paris, 31(4/5): 191-3, 1994.
9. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - Codex standards for edible fats and oils. Rome, FAO/WHO, 1982 (CAC - vol11).
10. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - Codex standards for edible - fats and oils. Rome, FAO/WHO, 1987. p. 46-75 (CAC - vol. 17).
11. CORDANI, L.K. & RIBEIRO-JR., R.S. - Identificação das características de qualidade do óleo de oliva. São Paulo, IME-USP, 50p. 1990. (SEA. Relatório de análise Estatística 9001).
12. DUNTEMAN, G.H. - Principal component analysis. Beverly Hills, Sage Publications, 1989, 96 p.
13. EM SP azeite adulterado é apreendido - Folha de São Paulo, São Paulo, 30 Janeiro, 1981. p. 33.
14. FIRESTONE, D.; CARSON, K.L.; REINA, R.J. - Update on control of olive oil adulteration and misbranding in the United States. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, 65(5) 788-92.
15. FIRESTONE, D.; SUMMER, J.L.; REINA, R.J.; ADAMS, W.S. - Detection of adulterated and misbranded olive oil products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, 62(11):1558-62, 1985.
16. GRACIAN, J. - The chemistry and analysis of olive oil. In: BOEKENOOGEN, H.A. *Analysis and characterization of oils, fats and fat products*. London. Interscience Publ., 1986, v.2p.317-591.
17. GROB, K.; LANFRANCHI, M.; MARIANIN, C. - Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the

- sterols and their esters by coupled LC-CG. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, **67**(10):626-34, 1990.
18. 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.
19. KAPOULAS, V.M. & ANDRIKOPOULOS, N.K. - Detection of olive oil adulteration with linoleic acid-rich oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., Amsterdam*, **366**:311-20, 1986.
20. KAPOULAS, V.M. & ANDRIKOPOULOS, N.K. - Detection of virgin olive oil adulteration with refined oils by second-derivative spectrophotometry. *Food Chem., Barking*, **23**:183-92, 1987.
21. KIRITSAKIS, A. & MARKAKIS, P. - Olive Oil: a review. *Adv. Food Res.*, New York, **31**:453-82, 1987.
22. LATTA, S. - Gourmet oils in the 1990s. *INFORM, Champaign*, **2**(2):98-113, 1991.
23. MARTINEZ MORENO, J. - Tendances modernes des recherches sur l'huile d'olive dans le cadre de la recherche sur les corps gras alimentaires. *Hev. Pr. Corps. Gras.*, Paris, **24**(6):293-301, 1977.
24. SOARES, L.S. & AMAYA, D.R. - Identificação e quantificação de adulterantes em óleo de oliva por cromatografia gasosa. *Bol. SBCTA, Campinas*, **15**(1):1-17, 1981.
25. SZPIZ, R.R.; PEREIRA, D.A.; JABLONKA, F.H. - Avaliação de óleos comestíveis comercializados no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA, 1985. 11p (EMBRAPA-CTAA Boletim de Pesquisa, 13).
26. TISCORNIA, E.; FORINA, M.; EVANGELISTI - Composizione chimica dell'olio di oliva e sue variazioni indotte dal processo di raffinazione. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, Milano, **59**(9):519-59, 1982.
27. TSMIDIU, M.; MACRAE, R.; WILSON, I. - Authentication of virgin olive oils using principal component analysis of triglyceride and fatty acid profiles: Part I - Classification of greek olive oils. *Food Chem., Barking*, **25**:227-39, 1987.
28. VAN NIEKERK, P.J. & BURGER, A.E.C. - The estimation of the composition of edible oil mixtures. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, Champaign, **62**(3) 531-8, 1985.
29. VIDAL, P.A.; RICCIARDI, A.J.; FERREIRA, J.F. - Determinação da adição de óleo de soja a outros óleos vegetais comestíveis por cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, **39**(1): 67-77, 1979.

Recebido para publicação: 01.02.94

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DE QUEIJO TIPO MINAS-FRESCAL DE PRODUÇÃO ARTESANAL, COMERCIALIZADO NA CIDADE DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

Crispin Humberto GARCIA-CRUZ*
Fernando Leite HOFFMANN*
Tania Maria VINTURIM*

RIALA6/765

GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMAN, F.L. & VINTURIM, T.M. - Estudo microbiológico de queijo tipo minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto - SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 78-82, 1994.

RESUMO: Onze amostras de queijos Minas-Frescal (100%), sendo sete amostras (63,6%) de queijos tipo Minas-Frescal fabricados artesanalmente, comercializados em bares, mercearias, açougues e supermercados de pequeno e médio portes da cidade de São José do Rio Preto - SP; três amostras de queijos industrializados (27,3%) e uma outra amostra de queijo (9,1%) elaborada sob estritas condições higiênico sanitárias, foram submetidas às seguintes análises microbiológicas: enumeração de bactérias aeróbias mesófilas; enumeração de bolores e leveduras; contagem de *Staphylococcus aureus*; determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais; pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella sp.* Os resultados obtidos foram comparados entre si e, de acordo com as legislações Federal e a do Estado de São Paulo, foi constatado que apenas a amostra (9,1%) elaborada sob estritas condições higiênico-sanitárias poderia ser consumida sem prejuízo à saúde pública.

DESCRITORES: Estudo microbiológico; Queijo Minas-Frescal; Produção artesanal.

INTRODUÇÃO

O queijo é um concentrado protéico-gorduroso constituído por caseína em forma de gel, matéria-graxa, ácido láctico e substâncias minerais, resultante da coagulação do leite¹. Este produto é conhecido pelo homem desde a antiguidade e é provável que o primeiro queijo tenha sido produzido de forma accidental, quando da estocagem do excesso de leite em condições que propiciaram sua coagulação¹. Atualmente as técnicas de fabricação de queijos estão mais desenvolvidas existindo no mercado queijos de diferentes valores nutritivos e sabores variados¹.

Os nomes dados aos queijos, originalmente, correspondiam à região onde eram fabricados, entretanto hoje isto não mais ocorre, já que os queijos são industrializados em todos os países. Um exemplo típico é o que acontece com o Cheddar, ori-

ginário de Cheddar, condado da Inglaterra e, que hoje é fabricado desde o Canadá até a Nova Zelândia¹. No Brasil o mesmo ocorre com o queijo tipo Minas-Frescal, originário do estado de Minas Gerais e que agora é produzido em larga escala em todo o país².

Existem várias indústrias que produzem o queijo Minas-Frescal, entretanto, como sua fabricação é relativamente simples e de baixo custo, a maioria dos queijos comercializados em bares, mercearias e açougues, são de fabricação caseira, existindo a tendência de comercializá-los em sacos plásticos comuns, amarrados ou fechados com um fecho metálico, porém sem usar vácuo. Durante a comercialização, esse saco plástico apresenta-se geralmente com um depósito de soro exsudado pelo produto. Essa dessora, que ocorre devido ao excesso de umidade nos queijos, além de proporcionar um aspecto pouco atraente ao produto, favorece o cresci-

* Universidade Estadual Paulista - Departamento de Tecnologia e Engenharia de Alimentos - São José do Rio Preto - SP.

mento microbiano causando odores desagradáveis. Por essas razões, o queijo tipo Minas-Frescal apresenta, geralmente, uma vida de prateleira muito curta, no máximo duas semanas, mesmo em temperaturas adequadas de refrigeração⁹.

A maioria dos queijos frescos tipo Minas-Frescal consumidos pela população brasileira, são provenientes de fazendas onde o acesso ao leite recém ordenhado é fácil e onde podem também ser fabricados. Esse leite geralmente não recebe nenhum tratamento para diminuir sua carga bacteriana. Esta condição se agrava se não houver higiene durante a elaboração do queijo e se este for transportado ou armazenado sem refrigeração¹.

A comercialização de queijo Minas, fabricado artesanalmente, tem sido indiscriminada e este fato pode acarretar prejuízos à saúde da população, tornando-se então necessário um monitoramento microbiológico dos produtos por ela consumidos. Portanto, no presente trabalho queijos tipo Minas-Frescal recém elaborados, comercializados em bares, açougues, mercearias e supermercados de pequeno e médio porte da cidade de São José do Rio Preto - SP, foram submetidos as seguintes análises microbiológicas: enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, enumeração de bolores e leveduras, contagem de *Staphylococcus aureus*, determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais e pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Para a obtenção das amostras dos queijos, a cidade de São José do Rio Preto foi dividida em sete zonas representativas. Cada zona foi denominada, respectivamente, como amostras A, B, C, D, E, F e G. Foram analisados também, para efeito de comparação, um queijo Minas-Frescal elaborado no laboratório (amostra H), assim como, um queijo do tipo microtexturizado (amostra I) e, duas amostras de queijo tipo Minas-Frescal de fabricação industrial de marcas diferentes (amostras J e L).

As onze amostras de queijo tipo Minas-Frescal foram coletadas assepticamente e transportadas ao laboratório para análise imediata.

Preparo das amostras

Foram trituradas com areia estéril 10 gramas de cada amostra, seguida de diluição em 90 ml de água destilada estéril. A partir desta diluição (10^{-1}), obtiveram-se as outras diluições seriadas até 10^{-8} retirando sempre volumes de 1 ml da diluição anterior e transferindo-os para 9 ml de água destilada estéril.

Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas

Foi empregada a técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se o ágar padrão para contagem com incubação a 35°C durante 48 horas².

Enumeração de bolores e leveduras

Foi feita com o uso da técnica de inoculação em profundidade, usando-se como meio de cultura o ágar batata dextrose, acidificado com solução aquosa de ácido tartárico a 10% até pH de 4,0. A incubação das placas de Petri foi feita a 25°C durante 5 dias².

Contagem de *Staphylococcus aureus*

A técnica empregada foi a de semeadura em profundidade. Usou-se como meio de cultura o ágar manitol e sal com incubação a 35°C durante 48 horas². As colônias suspeitas foram confirmadas através de testes bioquímicos e sorológicos.

Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, com três séries de três tubos de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Empregou-se como meio de cultura o caldo lauril sulfato triptose e foram adicionados também tubos de Durham para coletar o gás produzido durante a fermentação. A incubação foi feita a 37°C durante 48 horas e a determinação do NMP de coliformes totais, foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins. Para a determinação do NMP de coliformes fecais foi usado o caldo EC, com incubação a 44,5°C, em banho-maria, por 24 horas. A determinação do NMP de coliformes fecais, também foi feita com o auxílio da tabela de Hoskins².

Pesquisa de *Escherichia coli*

A partir dos tubos contendo caldo EC, que apresentaram gás no interior dos tubos de Durham, foram semeadas por esgotamento placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno. As colônias consideradas típicas de *E. coli* apresentaram coloração preta com brilho verde-metálico², sendo confirmadas posteriormente através de testes bioquímicos e sorológicos.

Pesquisa de *Salmonella sp*

Foram homogenizados 25 g de cada queijo em 225 ml de caldo lactosado. Após a incubação a 35°C, por 24 horas, 1 ml dessa suspensão foi transferido para 10 ml de caldo selenito-cistina, e incubado a 35°C. Depois de 24 horas, 48 horas e 5 dias foram realizadas semeaduras por esgotamento em placas de Petri contendo ágar SS (*Salmonella-Shigella*) e ágar verde brilhante². As colônias suspeitas foram confirmadas através de testes bioquímicos e sorológicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados das diferentes análises microbiológicas realizadas nos queijos obtidos em diferentes regiões da cidade de São José - SP. As amostras coletadas foram denominadas A, B, C, D, E, F e G. Foram analisados também, para efeito de comparação, um queijo Minas-Frescal elaborado no laboratório (amostra H), assim como, um queijo do tipo microtexturizado (amostra I) e, duas amostras de queijo tipo Minas-Frescal de fabricação industrial de marcas diferentes (amostras J e L).

A legislação do Estado de São Paulo¹¹ estabelece para *Staphylococcus aureus* a ausência em 0,01g; para coliformes fecais um máximo de $10^3/g$ e para *Salmonella* a ausência em 25 g. Na Tabela 1 pode ser observado que, excetuando-se a amostra H, todas as outras apresentaram contagens de *S. aureus* acima das exigidas por essa legislação¹¹ e em menor número que da legislação federal³ que estabelece para este microrganismo um máximo de $10^3/g$. Comparando esses resultados com os encontrados na literatura, verificou-se que de sessenta amostras de queijo tipo Minas examinadas na cidade do Rio de Janeiro 38,4% apresentaram contagens de *S. aureus* superiores a 10^3 UFC/g¹². Encontrou-se também 20,3% de amostras contaminadas com esse microrganismo na cidade de Lavras¹⁴. Foram constatadas que 67% das amostras analisadas no município de Belo Horizonte estavam contaminadas com essa bactéria em níveis variando entre 10^1 e 10^5 UFC/g (7). Encontrou-se também contagens de *S. aureus* variando entre $1,5 \times 10^2$ e $1,2 \times 10^5$ UFC/g na cidade de São Paulo⁵. Foram encontradas 62,75% de amostras contaminadas por essa mesma bactéria na cidade de Ouro Preto⁸. Alguns autores acreditam que este elevado número de bactérias contaminantes, do gênero *Staphylococcus*, são decorrentes das más condições higiênicas do leite cru destinado à produção do queijo tipo Minas-Frescal^{8,10,13}. Com relação a determinação de coliformes fecais, os resultados também foram altos para todos os queijos, exceto para as amostras H, I e L. Os coliformes fecais foram confirmados pela pesquisa de *E. coli* e todas as amostras analisadas foram positivas, exceto as denominadas com H e I. Algumas pesquisas similares também demonstraram altos resultados destes microrganismos^{4,12}. A presença de *Salmonella* foi confirmada em seis das onze amostras analisadas.

A análise global da Tabela 1 mostra que apenas a amostra H reunia as condições ótimas para ser consumida sem nenhum perigo potencial; uma vez que foi obtida de um queijo produzido no laboratório com condições higiênicas estritamente controladas. Para isto, o leite utilizado foi submetido a pasteurização

e o queijo produzido foi armazenado sob condições adequadas. De acordo com pesquisa realizada sobre o leite tipo C, uma das matérias primas que podem ser utilizadas para produção de queijos, verificou-se que se o mesmo não apresentar qualidade higiênico-sanitária satisfatória, poderá ser veículo de contaminação bacteriana, principalmente se não for adequadamente pasteurizado⁶. As contagens também foram baixas para a amostra I, talvez pelo fato de ser um queijo obtido por ultrafiltração e a única variável, que não foi avaliada, seria o tempo de armazenamento.

Já as outras amostras analisadas, foram obtidas em diferentes estabelecimentos comerciais e, portanto, as condições de armazenamento devem ter sido as mais variadas possíveis. A origem desses queijos, assim como as condições higiênicas utilizadas durante a sua elaboração são desconhecidas e segundo os resultados obtidos, não foram as mais adequadas.

Apesar da legislação federal e a do estado de São Paulo^{3,11} não fazer referência a enumeração de bactérias aeróbias mesófilas (talvez pelo fato de poderem estar aí incluídas as bactérias lácticas), bolores, leveduras e coliformes totais, essas análises foram realizadas para se ter um avaliação da carga bacteriana total encontrada nas diferentes amostras de queijo (Tabela 1).

Da comparação dos resultados, apresentados na Tabela 1, para as amostras de queijos de fabricação artesanal e os industrializados, pode-se dizer, que o número de bactérias aeróbias mesófilas, bem como o de bolores e leveduras foi bastante elevado para os queijos artesanais. Com relação a coliformes totais os resultados foram iguais para todos os queijos com exceção da amostra I. Entretanto, para coliformes fecais os queijos de fabricação industrial apresentaram resultados baixos, confirmando *E. coli* e apenas a amostra L apresentou e confirmou *Salmonella*.

CONCLUSÕES

A análise microbiológica das amostras de queijos tipo Minas-Frescal, tanto artesanais quanto industrializadas, mostrou que apenas uma amostra, aquela em que foram monitoradas as condições higiênico-sanitárias, poderia ser consumida sem perigo potencial. As altas contagens apresentadas pelas outras amostras podem ter as mais diferentes origens; no entanto, para a obtenção de um produto de boa qualidade microbiológica, recomenda-se cuidados que vão desde a obtenção das diferentes matérias primas, processamento, estocagem e distribuição, até o armazenamento para consumo final.

TABELA I

Representação dos resultados obtidos durante as diferentes análises microbiológicas.

Amostra	bactérias aeróbicas mesófilas (UFC X 10 ⁵ /g)		bolores e leveduras (UFC X 10 ⁴ /g)			Staphylococcus aureus (UFC X 10 ² /g)		coliformes totais NMP/g		coliformes fecais NMP/g		E. coli confirmativo	Salmonella presença em 25 g
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	5 dias	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas		
A	100	138	850	1.264	1.848	1.200	68.600	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	(+)	(+)
B	86	131	2	7	75	3	26	>1.100	>1.100	1.100	>1.100	(+)	(+)
C	191.500	193.000	3.750.000	4.120.000	6.890.000	2.000	1.500.000	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	(+)	(+)
D	225.500	304.000	190.000	765.000	980.000	3.500.000	187.000.000	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	(+)	(+)
E	247.000	469.000	9.030.000	11.920.000	22.220.000	500	500	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100	(+)	(-)
F	210.000	245.000	10.570.000	12.340.000	12.370.000	500	618.500	>1.100	>1.100	28	>1.100	(+)	(-)
G	318.000	464.5000	485.000	725.000	740.000	1.500	641.500	>1.100	>1.100	150	>1.100	(+)	(+)
H	2	1.500	1	1	1.245	(-)	(-)	>1.100	>1.100	<3	<3	(-)	(-)
I	5	5	(-1)	(-)	(-)	3	6	<3	>3	<3	<3	(-)	(-)
J	4	5	1	2	6	(-)	30	>1.100	>1.100	43	460	(+)	(-)
L	5	5	2	2	2	(-)	6	>1.100	>1.100	43	43	(+)	(+)

Padrão Estadual (11)

ausência em 0,01g
máxima 10³/g

máxima 10²/g
máxima 10²/g

ausência em 25g
ausência em 25g

Padrão Federal (3)

Legenda: (+) = presença
(-) = ausência

RIALA6/765

GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMAN, F.L. & VINTURIM, T.M. - Microbiological study of Brazilian Minas cheese of manual facturing commercialized at São José do Rio Preto (SP) city. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 78-82, 1994.

ABSTRACT: Samples of non-industrialized Minas Frescal cheese commercialized at grocery stores, butcher's shops, supermarkets and places alike in the city of São José do Rio Preto (State of São Paulo - Brazil) were submitted to microbial analysis. This analysis was followed by comparison with other results from samples of industrialized cheese and with a special kind of cheese made under strict hygienic-sanitary conditions. The results showed that only one sample filled the requirements to be consumed without potential damage to public health.

DESCRIPTORS: Microbiological study, Brazilian Minas cheese, Manual Manufacturing.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEHMER, M.L.A. *Tecnologia do leite*. 13ª ed. - São Paulo - Nobel. 1984. p.155-156.
2. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I. *Métodos microbiológicos*. Brasília, 1981.
3. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 001 de 28 de janeiro de 1987. *Diário Oficial*, Brasília, 25 de fevereiro de 1987. Aprova padrões microbiológicos para alimentos.
4. CARVALHO, E.P.; GOMES, R.C.; COSTA, L.C.G. Condições microbiológicas de queijo "Minas-Frescal" comercializado em Lavras, MG. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos 5. Viçosa, 1981, p.147.
5. FURLANETTO, S.M.P.; CERQUEIRA-CAMPOS, M.L. e IARA, S.T. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* em queijo Minas Frescal, vendido em supermercados do município de São Paulo. In: Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 9. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 12. São Paulo, 1983, p.144.
6. HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H. & VINTURIM, T.M. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" vendido na região de São José do Rio Preto - SP. *Bol. CEPPA* 11(2): jul/dez, 1993. (no prelo).
7. MANDIL, A.; MORAIS, V.A.D.; PEREIRA, M.L.; FAGUNDES, J.M.S.; CARMO, L.S.; CORREIA, M.G.; CASTRO, E.P. & GOMEZ, M.J.V.M. *Staphylococcus aureus* em queijos tipo "Minas". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 2(2):233-241, 1982.
8. NASCIMENTO, D.; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N. e XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas-Frescal da cidade de Ouro Preto (MG). *Bol. SBCTA*, 19(2):120-129, 1985.
9. OLIVEIRA, J.S. *Queijo: fundamentos tecnológicos*. São Paulo-Ed.Ícone/Campinas/UNICAMP. 1986. p.105-114.
10. SANTOS, E.S.; GENIGEORGIS, C. & FAVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas Cheese. *J. Food Protection*, 44 (3):172-176, 1981.
11. SÃO PAULO (Estado) Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Aprova norma técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial*, v.88, nº 200, p.142, São Paulo, 21 de outubro de 1978.
12. SILVA, C.A.M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos tipo Minas-Frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 4. Rio de Janeiro, 1980, p.202.
13. WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. *Rev. de Saúde Pública*, São Paulo, 11(1):1-11, 1977.

Recebido para publicação: 23.02.94

ESTUDO MORFOLÓGICO DA ANEMIA EM IDOSOS*

Ryuko MIYAMARU YOKOMIZO **
Hyun Mo YANG ***
Fernanda Alves CANGERANA **
Elena Yoko GUSHIKEN **
Luiz Italo NIERO **
Marcos Antonio Gonçalves MUNHOZ **

RIALA6/766

MIYAMARU YOKOMIZO, R.; YANG, H.M.; CANGERANA, F.A.; GUSHIKEN, E.Y.;
NIERO, L.I. & MUNHOZ, M.A.G. - Estudo morfológico da anemia em idosos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 83-7, 1994.

RESUMO: A partir de 2497 hemogramas de idosos não hospitalizados (≥ 60 anos) de ambos os sexos, realizados no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central, no período de 1990 a 1992, triamos 333 exames que apresentavam anemia, para realizar um estudo morfológico nesta amostra.

A anemia mais frequente foi a normocítica normocrômica (72,4%), seguida da microcítica normocrômica (11,4%).

As alterações eritrocitárias mais encontradas foram: anisocitose (64,3%), poiquilocitose (12,3%), policromasia (9%) e pontilhado basófilo (3,6%).

Hipocromia (CHCM $< 31\%$) foi observada em 15,0% dos casos.

A análise morfológica do sangue periférico de indivíduos anêmicos é fundamental para auxiliar nas decisões clínicas a serem tomadas.

DESCRIPTORIOS: Idosos, anemia, alterações eritrocitárias.

INTRODUÇÃO

O número e a forma pela qual as hemácias apresentam-se no sangue periférico, associadas a valores e índices hematimétricos, podem refletir a clínica dos pacientes, em especial àqueles com doenças infecciosas, inflamatórias, neoplasias e anemias.

As alterações morfológicas observadas em uma anemia são fundamentais para a interpretação de sua etiologia e da adoção de condutas clínico-laboratoriais específicas.

Segundo Rappaport et al¹⁹, os idosos que representam um segmento crescente da população dos Estados Unidos, no ano 2000, haverá um número de pessoas com idade acima de 75 anos aumentadas em

26%, em relação a uma taxa de nascimento de 12% e de mortalidade de 9%.

Litvak & Maggi¹¹ estimam que no ano 2025, nos Estados Unidos, um em cada 3 americanos idosos terá 80 anos ou mais, e atualmente a população nessa faixa etária é de 14%. No Brasil, a tendência de aumento nesta faixa etária também será percebida¹¹.

Segundo o Boletim de La Oficina Sanitária Panamericana¹, na América Latina e Caribe, no ano 2000, o número de pessoas com 60 anos ou mais aumentará para 40,9 milhões (7,2% da população) e no ano 2025 será de 93,3 milhões (10,8% da população).

Nos Estado Unidos, Salive et al²¹, em 1992, encontraram 12,0% de anemia em idosos; e no Brasil,

* Realizado na Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central.

** Da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Disciplina de Informática Médica da FMUSP.

Cangerana et al², em 1994 encontraram uma frequência de 13,3%.

Devido a importância da anemia em idosos como doença primária ou secundária à diversas doenças e o pequeno número de trabalhos existentes em nosso meio sobre esta síndrome nesta faixa etária, procuramos apresentar e analisar as principais alterações morfológicas observadas no sangue periférico de idosos anêmicos, ressaltando a importância do hemograma minucioso como exame complementar à clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados retrospectivamente 2497 hemogramas de pessoas com 60 anos de idade ou mais, de ambos os sexos, realizados no INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Laboratório Central, entre o anos de 1990 a 1992. Esses exames eram provenientes dos Centros de Saúde do ERSA 2 (Escritório Regional de Saúde 2), Município de São Paulo. Destes, 333 exames apresentavam anemia (165 homens e 168 mulheres). Esses hemogramas foram realizados de maneira convencional e os esfregaços sanguíneos foram corados pelo corante de Leishman.

Consideramos anêmicos, os casos que apresentaram valores de hemoglobina abaixo de 13,6 g/dL para os homens e 12,6 g/dL para mulheres, valores estes estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ao nível do mar como 13,0 e 12,0 g/dL respectivamente^{3,16}, acrescidos de 0,6 g/dL devido a cidade de São Paulo estar situada cerca de 900 metros de altitude.

Usamos como valores de normalidade para o VCM de 80 a 100 μ^3 e para o CHCM de 32 a 36%. Consideramos como sendo hipocromia, os casos com CHCM < 31%, segundo a OMS¹⁶.

O critério mínimo para que uma alteração fosse considerada uma cruz (1+) foi o achado com dificuldade e com especial atenção; duas cruces (2+) quando o achado da alteração não apresentou dificuldade nem especial atenção, porém presente em pequeno número de células; três cruces (3+) quando a alteração foi observada em muitos campos mas não em todas as células e quatro cruces (4+) quando a alteração foi observada em todos os campos e em todas as células.

O estudo estatístico dos índices hematimétricos (VCM e CHCM) para caracterização do tipo morfológico da anemia, segundo a idade e o sexo, foi realizado através do teste X^2 (qui-quadrado) para a estatística enumerável⁴.

Realizamos também um Teste de Hipóteses com o objetivo de verificar o significado estatístico das

frequências encontradas e adotamos $p < 0,10$ como região de rejeição, pois a amostragem decaiu ao longo dos anos.

RESULTADOS

Nos 333 hemogramas estudados, a anemia mais encontrada foi a normocítica normocrômica (72,4%). Na tabela 1, apresentamos, o número de casos e as frequências do tipo de anemia encontradas na população estudada.

TABELA 1

Frequência do tipo de anemia em idosos de ambos os sexos

Anemia	Casos (n)	Frequência (%)
Normocítica normocrômica	241	72,4
Normocítica hipocrômica	28	8,4
Microcítica normocrômica	38	11,4
Microcítica hipocrômica	21	6,3
Macroscítica normocrômica	4	1,2
Macroscítica hipocrômica	1	0,3

Na tabela 2 apresentamos a frequência do tipo de anemia discriminada pelo sexo. Comparando com a tabela 1, encontramos, o valor de X^2 com 5 graus de liberdade dado por $X^2(5) = 5,53$. Isso resulta em $p < 0,30$. Portanto, não existe diferença estatística das frequências encontradas em relação ao sexo comparada com a da população.

As formas mais comuns, ou sejam, as microcíticas e normocíticas apresentam valores de frequência compatíveis com os valores de frequência da população.

O valor de X^2 para os seus componentes são: para normocíticas $X^2(1) = 0,18$ ($p < 0,60$), para microcíticas $X^2(1) = 1,33$ ($p < 0,20$) e para macrocíticas $X^2(1) = 1,02$ ($p < 0,30$). Em relação ao sexo, a anemia microcítica foi a que contribuiu com maior variação relativa à da população.

Todos esses valores estão na faixa de não rejeição da igualdade das frequências.

Na tabela 3 apresentamos a frequência do tipo de anemia discriminada pelo sexo e pela faixa etária. Nessa tabela, não considerando o sexo e comparada com a tabela 1, encontramos o valor $X^2(10) = 24,83$, resultando em $p < 0,05$. Portanto, rejeita-se a hipótese da igualdade das frequências encontradas em relação às faixas etárias comparadas à da população. O valor de X^2 para seus componentes são: para normocíticas $X^2(2) = 3,15$ ($p < 0,20$), para microcíticas $X^2(2) = 19,53$ ($p < 0,005$) e para macrocíticas $X^2(2) = 2,15$ ($p < 0,30$). Em relação ao

TABELA 2

Frequência do tipo de anemia discriminada pelo sexo Homens (H) e Mulheres (M)

Anemia	Casos (H)	Freq. (%)	Casos (M)	Freq. (%)
Normo. normocr.	119	72,1	122	72,6
Normo. hipocr.	15	9,1	13	7,7
Micro. normocr.	16	9,7	22	13,1
Micro. hipocr.	12	7,3	9	5,4
Macro. normocr.	2	1,2	2	1,2
Macro. hipocr.	1	0,6	0	0,0
Total	165	100,0	168	100,0

normo: normocítica, micro: microcítica, macro: macrocítica
normocr: normocrômica, hipocr: hipocrômica

sexo e faixa etária, a anemia microcítica foi a que contribuiu com maior variação relativa à da população e está na faixa etária de rejeição da igualdade de frequência; e influenciou no resultado geral porque o número de casos de anemia microcítica neste caso não é desprezível (18%) em relação à outras duas formas de anemia.

TABELA 3

Frequência do tipo de anemia discriminada pelo sexo e faixa etária

Anemia	Freq. (%) Homens			Freq. (%) Mulheres		
	A	B	C	A	B	CA
Normo. normocr.	62,7	80,0	80,0	64,0	78,4	84,2
Normo. hipocr.	9,3	10,0	5,0	8,0	6,8	10,5
Micro. normocr.	10,7	8,6	10,0	16,0	13,5	0,0
Micro. hipocr.	16,0	0,0	0,0	9,3	1,3	5,3
Macro. normocr.	0,0	1,4	5,0	2,7	0,0	0,0
Macro. hipocr.	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Nº casos	75	70	20	75	74	19

A: 60 a 69 anos, B: 70 a 79 anos, C: 80 anos ou mais

Na tabela 4, apresentamos as principais alterações eritrocitárias encontradas nos hemogramas dos idosos anêmicos estudados.

TABELA 4

Frequência de alterações eritrocitárias encontradas nos idosos anêmicos

Alteração	Frequência (%)
Anisocitose (1+ a 4+)	64,3
Poiquilocitose (1+ a 4+)	12,3
Policromasia (1+ a 4+)	9,0
Pontilhado basófilo (1+ a 4+)	3,6
Hipocromia (CHCM < 31%)	15,0

DISCUSSÃO

A anemia é uma das doenças mais comuns em idosos²¹. É descrita numa incidência que varia de 6 a 30 % nos homens e 10 a 22% nas mulheres^{8,12,21}. Alguns estudos demonstram que há uma prevalência mais alta de anemia em idosos de populações de baixo nível sócio econômico¹².

A carência de nutrientes principalmente ferro, folato e vitamina B12, além das doenças crônicas, inflamações, perda de sangue, hemólise, alcoolismo e uso de medicamentos, são as principais causas de anemia em idosos¹². Parece haver nos idosos um declínio da função medular, com diminuição das reservas celulares¹². A idade das células replicadoras e o microambiente medular também são importantes para a capacidade de multiplicação celular.

É muito provável que a etiologia da anemia em idosos seja multifatorial¹².

A anemia mais encontrada por nós foi a normocítica normocrômica (72,4%). Em relação ao sexo, as mulheres apresentaram esta anemia com uma frequência ligeiramente maior do que os homens (tabela 2). Segundo Rappaport, a anemia normocítica está frequentemente associada à quadros hemolíticos, agressões medulares ou doenças endócrinas²⁰.

Nesta anemia, pela contagem dos reticulócitos podemos observar duas situações bem definidas: aumento ou diminuição na produção de células vermelhas jovens. Devido ao fato de o estudo ser retrospectivo, não tivemos controle sobre a contagem de reticulócitos que foi muito pouco solicitada (0,6% dos casos).

No estudo da anemia, a contagem dos reticulócitos é fundamental, pois a partir dela se obtém o índice reticulocitário (IR), importante parâmetro para a avaliação etiológica da anemia. IR menor do que 2% indica anemia por eritropoese ineficaz ou falência medular, enquanto que IR maior do que 3% (em geral entre 3% e 6%) sugere quadro hemorrágico agudo, hemolítico crônico ou resposta eficiente à terapia¹⁰. As anemias por deficiência de ferro, folato, vitamina B12, infecções crônicas e radioterapia, em geral cursam com contagens de reticulócitos diminuídas^{7,20}.

Apesar de não termos a contagem de reticulócitos, na maioria dos casos encontramos 9% dos casos com policromasia importante, o que sugere um aumento no número de reticulócitos nesses casos.

O segundo tipo de anemia mais frequente foi a microcítica normocrômica. Consideramos esse grupo de anemia como uma forma transicional, possível-

mente entre a normocítica normocrômica e a microcítica hipocrômica.

A alteração eritrocitária mais encontrada foi a anisocitose (64,3%). Entretanto, a anemia mais frequente foi a normocítica; provavelmente decorrente do fato de que muitos idosos apresentavam microcitose e macrocitose concomitantemente, equilibrando o VCM.

Observamos 6,3% de casos com anemia microcítica hipocrômica (tabela 1). Os homens apresentaram esta anemia com uma frequência discretamente aumentada em relação às mulheres (tabela 2).

Joosten et al⁸ e Serra Valdés et al²² encontraram anemia ferropriva e anemia associada à doença crônica como sendo as mais comuns em idosos hospitalizados. Rappaport et al²¹ e McKay et al¹³ também encontraram essas anemias como as mais comuns em idosos não hospitalizados. A anemia de doença crônica pode ter início com normocitose e posteriormente tornar-se microcítica, gerando confusão com a anemia ferropriva¹³. A anemia ferropriva instalada cursa com microcitose, alguns ovalócitos, hipocromia e depósitos medulares de ferro ausentes. Na anemia de doença crônica os depósitos medulares de ferro estão bem supridos, com macrófagos repletos de ferro. Entretanto, o ferro por um mecanismo não totalmente esclarecido, é muito pouco utilizado^{13,20}. A hipocromia (CHCM < 31%) foi encontrada em 15,0% dos casos, com 87% de correlação positiva com o aumento do halo interno eritrocitário, observado nos esfregaços sanguíneos indicando tal alteração.

Em relação ao sexo, as mulheres apresentaram frequência de anemia microcítica superior aos homens (tabela 2). Parasuramalu et al encontraram mais anemia em mulheres do que em homens, provavelmente devido à carência de ferro, resultante da deficiência deste nutriente em suas dietas¹⁸.

Encontramos diminuição da frequência de anemia microcítica em relação ao aumento da idade (tabela 3). Segundo Salive et al²¹, a microcitose diminui entre os idosos com mais idade de ambos os sexos, enquanto a macrocitose aumenta com a idade somente nos homens.

Observamos 1,8% de homens e 1,2% de mulheres com anemia macrocítica (tabela 2).

Frequentemente, a anemia macrocítica é decorrente da carência de folato e ou vitamina B12 ou por doenças hepáticas^{7,12,17}.

A poiquilocitose foi encontrada em 12,3% dos casos, com predominância de ovalócitos, hemácias em alvo e hemácias crenadas. As outras formas de poiquilocitose foram observadas em porcentagens mínimas. Nas anemias ferroprivas e talassemias uma discreta ovalocitose pode estar presente. A macroovalocitose está presente nas anemias macrocíticas por deficiência de folato ou vitamina B12^{5,7,20}.

Nas anemias macrocíticas, por causa hepática, a macro-ovalocitose normalmente não é observada.

Na anemia ferropriva, doenças hepáticas, anemias hereditárias (hemoglobinopatias S,C, talassemias), as hemácias em alvo sempre estão presentes⁵. As anemias hereditárias, na forma heterozigota, podem passar despercebidas ao longo da vida, pois os sintomas e sinais clínicos apresentados, em geral são pouco evidentes e, no hemograma, as alterações eritrocitárias podem ser muito discretas.

Estados febris e desidratação podem cursar com hemácias crenadas^{6,23}. Pontilhado basófilo foi encontrado em 3,6% dos casos. Esta alteração eritrocitária pode ser encontrada em várias anemias, porém é muito observada nas talassemias, intoxicação pelo chumbo e leucemias⁶.

CONCLUSÕES

As alterações morfológicas encontradas nos hemogramas de idosos anêmicos são importantes, pois em conjunto com os índices e valores hematimétricos e contagem de reticulócitos, orientam quanto a etiologia da anemia e podem influir decisivamente na conduta clínica a ser tomada. Assim, todas as observações hematológicas devem ser criteriosas e retratar fielmente a realidade, fazendo do hemograma um exame complementar importante no diagnóstico clínico.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a orientação do Dr. Ademar Longatto Filho, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

RIALA6/766

MIYAMARU YOKOMIZO, R.; YANG, H.M.; CANGERANA, F.A.; GUSHIKEN, E.Y.; NIERO, L.I. & MUNHOZ, M.A.G. - The morphological study of anemia in elderly. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 83-7, 1994.

ABSTRACT: During the 1990-1992 period, 2497 hemograms from elderly out-patients of both sexes aged ≥ 60 , were performed at Adolfo Lutz Institute, Central Laboratory.

For morphological study of anemia in this sample, 333 of them all presenting anemia were selected.

The most frequent anemia was normochromic normocytic (72,4%), followed by normochromic microcytic (11,4%).

The most frequent erythrocytary alterations were: anisocytosis (64,3%), poikilocytosis (12,3%), polychromasia (9%) and basophilic stippling (3,6%).

Hypochromia (MCHC < 31%) was observed in 15,0% of the studied cases.

The morphological analysis of peripheral blood in the anemic individuals is fundamental to help in clinical decisions to be taken.

DESCRIPTORS: elderly, anemia, erythrocytary alterations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLETIM DE LA OFICINA SANITARIA PANAMERICANA Vol. 104(6), 1988.
2. CANGERANA, F.A.; YANG, H.M.; YOKOMIZO, R.M.; MUNHOZ, M.A.G.; GUSHIKEN, E.Y.; & NIERO, L.I. Freqüência de anemia em idosos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, Vol. 53(1/2): 71-75, 1993.
3. DeMAEYER, E.M. Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care. A guide for health administrators and programme managers. Geneva. WORD HEALTH ORGANIZATION, 1989.p.26.
4. DIXON, W.J. MASSEY JR, F.J. Introduction to Statistical Analysis. McGraw Hill, 4th ed. New York, 1983.
5. EVATT, B.L.; LEWIS, S.M.; LOTHE, F. & McARTHUR, J.R. Anemia: fundamental diagnostic hematology. Atlanta, CDC; WHO, 1983p.121 (CDCLabManual).
6. FAILACE, R.R. Hemograma: Manual de Interpretação, Porto Alegre, Gráfica Metrópole S.A.p.194, 1991.
7. HOFFBRAND, A.V. & PETTIT, J.E. Essential Haematology 3th ed. London, Blackwell, 1993. p.437.
8. JOOSTEN, E.; PELEMANS, W.; HIELE, M.; NOYEN, J.; VERHAEGHE, R. & BOOGAERTS, M.A. Prevalence and causes of anaemia in a geriatric hospitalized population. *Gerontology* 38:111-117, 1992.
9. KOEPKE, J.A. Hepatic disease and anemia. *LabMed* 5(2):21-24, 1988.
10. KOEPKE, J.F. Flow cytometric reticulocyte counting. *LabMed* 6(3):27-32, 1989.
11. LITVAK, J. & MAGGI, S. Aging. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 5(2):353-363, 1991.
12. MANSOURI, A. & LIPSCHITZ, D.A. Anemia em pacientes idosos. *Med. Clin. North Am.* 3:627-638, 1992.
13. MCKAY, P.J.; STOTT, D.J.; HOLYOAKE, T.; HENDRY, A.; MACDONALD, J.B. & LUCIE, N.P. Use of the erythrogram in the diagnosis of iron deficiency in elderly patients. *Acta Haematol.* 89:169-173, 1993.
14. MILNE, J.S. & WILLIAMSON, J. Hemoglobin, hematocrit, leukocyte count and blood grouping in older people. *Geriatrics* 59:118-126, 1972.
15. OHARA, K.; SUZUKI, Y. & OHARA, K. Laboratory tests in the diagnosis and treatment of alcoholism. *LabMed* 5(2):17-19, 1988.
16. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Serie de informes tecnicos. Número 503. Anemias nutricionales, 1972.
17. OTERO, G.C.; MENKE, D. & HOOK, C.C. A practical approach to the differential diagnosis and evaluation of the adult patient with macrocytic anemia. *Med. Clin. North Am.* 76(3):581-597, 1992.
18. PARASURAMALU, B.G.; VASTRAD, S.A. & SHIVARAM, C. Prevalence of anaemia in the aged population in selected slums of HUBLI City. *Indian J. Public Health* 33(2): 117-118, 1990.
19. RAPPAPORT, E.S. & HELBERT, B.J. Hematology of the elderly. *LabMed* 9(2):20-23, 1992.
20. RAPPAPORT, S.I. Introdução à Hematologia 2.ed. São Paulo, Roca, 1990. p.450.
21. SALIVE, M.E.; HUNTLEY, J.C.; GURALNIK, J.M.; PHILLIPS, C.L.; WALLACE, R.B.; OSTFELD, A.M. & COHEN, H.J. Anemia and hemoglobin levels in older persons: relationship with age, gender, and health status. *J. Am. Geriatr. Soc.* 40:489-496, 1992.
22. SERRA VALDÉS, M.A.; MESA, B.B. & SELSDEDOS, A.M. Anemias en el paciente geriátrico hospitalizado. *Rev. Cub. Med.* 25:715-727, 1986.

Recebido para publicação: 17.03.94

BACTÉRIAS DO GÊNERO *HAEMOPHILUS* ISOLADAS DE SANGUE E
IDENTIFICADAS NA SEÇÃO DE BACTERIOLOGIA, INSTITUTO ADOLFO LUTZ,
NO PERÍODO DE 1979 A 1991*

Maria de Fátima Paiva VIEIRA**
Braz MEZZACAPA NETO**
Ilka Maria LANDGRAF**
Sônia Shizue Okita BUSCHINELLI**
Maria Lucia Ceconi TONDELLA**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Vera Simonsen Dias VIEIRA**

RIALA6/767

VIEIRA, M.F.P.; MEZZACAPA NETO, B.; LANDGRAF, I.M.; BUSCHINELLI, S.S.O.;
TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. - Bactérias do
gênero *Haemophilus* isoladas de sangue, na Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo
Lutz no período de 1979 a 1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 88-92, 1994.

RESUMO: De culturas de sangue foram isoladas e identificadas 267 amostras bacterianas do gênero *Haemophilus*, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo no período de 1979 a 1991. *H. influenzae* correspondeu a 91,0% (243 cepas) da totalidade dos casos com a predominância do biotipo I (65,9%) seguido dos biotipos II (29,6%), III (2,1%), IV (0,8%) e V (1,6%). Na quase totalidade das cepas o sorotipo b prevaleceu (93,0%) e apenas uma amostra bacteriana foi caracterizada como sorotipo f. *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* ocorreu em 7,5% dos casos, tendo as 20 cepas isoladas apresentado as características fenotípicas e genotípicas do agente etiológico da Febre Purpúrica Brasileira. O *H. parainfluenzae* foi identificado em 4 amostras, 2 delas pertencendo ao biotipo I, outras aos biotipos II e V. Considerando o número de amostras de sangue de cada paciente, pôde-se observar que em 29,5% dos casos o agente etiológico não se desenvolveu na totalidade das mesmas, indicando a necessidade de amostras múltiplas de sangue para o diagnóstico de doenças invasivas.

DESCRITORES: *Haemophilus*; *H. influenzae*, biotipos e sorotipos; *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*; *H. parainfluenzae*; hemocultura.

INTRODUÇÃO

A hemocultura tem grande importância no diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas invasivas como também no controle de infecções em ambientes hospitalares¹³. Nas infecções bacterêmicas simples as enterobactérias tem prevalecido em nosso meio, seguidas de cocos Gram-positivos, de bacilos Gram-negativos aeróbios estritos, de *Haemophilus* e de diplococos Gram-negativos².

O *Haemophilus influenzae*, principalmente o sorotipo b, tem sido apontado como uma das principais causas de doença invasiva em crianças com idade inferior a 5 anos¹⁸. É também o agente etiológico mais frequente em meningites bacterianas¹⁵, o que conduz à indicação da cultura de sangue para diagnóstico etiológico¹.

O *H. aegyptius*, agente responsável por conjuntivites purulentas vem, desde 1984, ocasionando uma

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

doença sistêmica em crianças menores de 10 anos, denominada Febre Purpúrica Brasileira (FPB), em várias regiões do País. Este microrganismo foi posteriormente caracterizado como *H.influenzae* biogrupo aegyptius⁴, sendo o sangue a fonte principal para o seu isolamento e diagnóstico laboratorial⁹. Desta forma a hemocultura constitui-se, até o momento, no único método de confirmação do diagnóstico clínico, assumindo importância particularmente relevante quando se propõe a esclarecer o agente etiológico da FPB.

Considerando que diferentes espécies do gênero *Haemophilus* também podem provocar infecções sistêmicas, foi feito um estudo retrospectivo das bactérias deste gênero que puderam ser isoladas de cultura de amostras de sangue na Seção de Bacteriologia ou recebidas de hemocultura processadas em outros laboratórios, no período de 1979 a 1991.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 267 cepas de *Haemophilus* sp originadas de cultura de sangue de pacientes internados com a febre a esclarecer em vários hospitais da Rede Pública do Estado de São Paulo e outros Estados. Os frascos de cultura semeados ou as cepas já isoladas, foram enviadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Os meios de cultura empregados para as hemoculturas consistiram de caldo triptose soja (TSB) ou caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), acrescidos de sulfato de polianetol sódico (SPS) a 0,05%².

Os frascos foram semeados no momento da punção sanguínea, na proporção de 10% do meio de cultura, ou seja, 10 ml de sangue para 50 ml do meio de cultura, e levados à incubação a 35-37°C. Estes frascos de cultura semeados foram examinados macroscopicamente, diariamente, durante 7 dias para se evidenciar turvação. Havendo tais alterações, foi recolhida uma alíquota de material, asépticamente, através de seringa ou colecut BCB VENT/SVB UNIT (Difco) e realizado esfregaço corado pelo Gram, modificado por Hucker⁸. Dos frascos que permaneceram inalterados foram feitos subcultivos após 2 e 5 dias de incubação, em tubos contendo ágar chocolate constituído de base BHI acrescida de 10% de sangue estéril de cavalo ou coelho. Os tubos foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera de 5 a 10% de CO₂, durante 24-48 h, para confirmação de resultados negativos.

A ocorrência de crescimento bacteriano com presença de bacilos Gram negativos pleomórficos com morfologia de colônias semelhantes às apresentadas pelo gênero *Haemophilus* orientou para a realização da prova de satelitismo. A comprovação da presença

de *Haemophilus* levou à caracterização bioquímica e sorológica da cepa, segundo metodologia previamente descrita^{3,6,7,11,12,14}.

RESULTADOS

Das 267 cepas de *Haemophilus* sp, isoladas de sangue no período de 1979 a 1991, 243 (91,0%) foram caracterizadas como *H.influenzae*. Entre as cepas de *H.influenzae* houve maior ocorrência do biotipo I (65,9%) e do sorotipo b (93,0%). Um total de 11 cepas não apresentaram capsula (NT) e em 5 cepas não pôde ser realizada a soroglutinação (Tabela 1). Nesse mesmo período foram isoladas 20 (7,5%) cepas de *H.influenzae* biogrupo aegyptius, de pacientes com suspeita clínica de FPB. Estas cepas apresentaram resultados de provas bioquímicas compatíveis com a espécie e demonstraram reação de soroglutinação positiva com o antissoro policlonal. Outras 4 (1,5%) cepas foram definidas como *H.parainfluenzae* (Tabela 2) que apresentaram a capacidade de sintetizar a porfirina (ALA), fermentar a glicose (com produção de gás), e a sacarose po-

TABELA 1

Sorotipos e biotipos de 243 cepas de *H. influenzae* isoladas de sangue

Sorotipo	Biotipo					Total	
	I Nº %	II Nº %	III Nº %	IV Nº %	V Nº %	Nº	%
b	146	71	4	2	3	226	93,0
f	1	-	-	-	-	1	0,4
NT	8	1	1	-	1	11	4,5
NR	5	-	-	-	-	5	2,1
Total	160(65,9)	72(29,6)	5(2,1)	2(0,8)	4(1,6)	243	(100,0)

NT = não tipável

NR = não realizado

TABELA 2

Provas diferenciais que caracterizaram os biotipos das 4 cepas de *H. parainfluenzae* isoladas de sangue

	Biotipos							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ornitina-D	+	+	-	+	-	+	-	-
Urease	-	+	+	+	-	-	+	-
Triptofanase (Indol)	-	-	-	+	-	+	+	+
Total	2	1	0	0	1	0	0	4

+ = reação positiva

- = reação negativa

TABELA 3

Distribuição do número de amostras de hemocultura positivas para *haemophilus* sp de cada paciente, em relação ao número de amostras de hemocultura enviadas

Amostras Positivas	Total	Pacientes
1 ^a /1 ^b		42,6%
2/2		24,0%
3/3		3,9%
1/2		13,9%
1/3		10,9%
2/3		4,7%

a = N° de amostras de hemocultura positivas

b = N° de amostras de hemocultura enviadas

rém não desdobraram a xilose, lactose e manita.

Relacionando o número de amostras de hemoculturas positivas com o número de amostras enviadas de cada caso suspeito, pôde-se observar que em 70,5% dos casos o número de amostras enviadas correspondeu ao número de culturas positivas, entretanto para 29,5% dos casos clínicos nem todas as amostras recebidas puderam revelar o agente etiológico.

DISCUSSÃO

Das 267 cepas do gênero *Haemophilus* estudadas, foram identificadas espécies diferentes e todas tiveram o teste de satelitismo positivo. Desta forma pôde-se demonstrar que esta prova não contribui para definir a espécie. Este trabalho demonstrou a importância da caracterização das espécies do gênero *Haemophilus*, através de provas bioquímicas e enzimáticas, que contribuíram para a verificação de que *H.influenzae* foi a espécie predominante entre as estudadas sendo esse microrganismo um dos agentes mais frequentes de meningites bacterianas.

Embora *H.influenzae* biotipo I e o sorotipo b sejam os biotipos e sorotipos mais frequentemente isolados de cepas invasivas de *H.influenzae*, neste estudo foi também identificada uma cepa de *H.influenzae* do sorotipo f. Este sorotipo já tem sido isolado do sangue por outros autores como McGow-

an et alii¹⁶ que identificaram duas cepas do sorotipo f, Kamme¹⁰ que relatou a ocorrência de uma cepa e Wallace¹⁷ de 3 cepas provenientes do sangue de três pacientes com pneumonia.

Irino e col⁹, estudando 15 casos de FPB, dos quais materiais biológicos como sangue, líquido cefalorraquidiano, secreção de conjuntiva e orofaringe foram examinados, observaram que a cultura de sangue foi positiva em 80% dos casos, o que elege esse exame para o diagnóstico laboratorial dessa infecção.

A ocorrência de cepas de *H.parainfluenzae* nas culturas de sangue, como também já relatado por Brunn et alii³, comprova a importância de se complementar, com provas bioquímicas e enzimáticas, a observação de um satelitismo positivo para a definição da espécie do gênero *Haemophilus*.

Segundo Bone¹, "A frequência com que sítios múltiplos de infecção piogênica estão associados à meningite por *Haemophilus* em crianças com menos de 2 meses de idade comprova que cultura de sangue não é apenas útil, mas também uma investigação adicional necessária".

Este estudo, embora direcionado para caracterização das espécies do gênero *Haemophilus*, demonstrou a importância da cultura de sangue, em vista da ocorrência de positividade desses exames laboratoriais em 5 pacientes que tiveram também o LCR examinado, mas com resultados negativos (dados não demonstrados). De outros 62 pacientes com culturas positivas de sangue e de LCR, os resultados nos dois exames foram compatíveis para o mesmo biotipo e sorotipo de *H.influenzae*.

Segundo Koneman¹³, a obtenção de uma amostra de sangue para cultura, imediatamente antes de um pico febril, é ideal porque este é o período de maior concentração de microrganismos circulantes. No entanto como este pico não pode ser previsto, recomenda-se, geralmente, que as hemoculturas de rotina sejam obtidas de diferentes locais de punção venosa com, no mínimo, uma hora de diferença. Neste trabalho foi comprovada a importância dessa recomendação, pois em cerca de 29,5% dos casos a positividade da cultura não ocorreu em todas as amostras enviadas. Esta observação reforça a importância da recomendação de serem enviadas várias amostras de sangue de cada paciente, principalmente nas bacteriemias com febres intermitentes, possibilitando assim a maior probabilidade de obtenção de cultura positiva.

RIALA6/767

VIEIRA, M.F.P.; MEZZACAPA NETO, B.; LANDGRAF, I.M.; BUSCHINELLI, S.S.O.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. - Bacteria of the genus *Haemophilus* isolated from blood in the Section of Bacteriology, Instituto Adolfo Lutz in the period of 1979 to 1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 88-92, 1994.

ABSTRACT: From blood cultures, 267 strains of the *Haemophilus* genus were isolated and identified in the Seção de Bacteriologia of the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, in the period 1979 to 1991 *H. influenzae* accounted for 91,0% (243 strains) of the total cases, with biotype I (65,9%) predominating, followed by biotypes II (29,6%), III (2,1%), IV (0,8%), and V (1,6%). In most cases serotype b was predominant (93,0%), and only one strain was characterized as serotype f. *H. influenzae* biovar aegyptius occurred in 7,5% of the cases, having all the 20 isolated strains shown the phenotype and genotype characteristics of the etiologic agent of the Brazilian Purpuric Fever. *H. parainfluenzae* was identified in 4 of the strains, being two of biovar I, and one each of biovar II and V. Concerning the number of blood samples of every patient, it was noteworthy that in 29,5% of the cases, the etiologic agent did not develop in all of the samples, showing the meaning of multiple blood samples for the diagnosis of invasive diseases.

DESCRIPTORS: *Haemophilus*; *H. influenzae*, biotypes and serotypes; *H. influenzae* biovar aegyptius; *H. parainfluenzae*; blood culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BONE, F.J. - Meningitis due to an unusual type of *Haemophilus influenzae*. *Scot. Med. J.*, 20:19-21, 1975.
2. BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D.; & PESSOA, G.V.A. - Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):115-123, 1984.
3. BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; TONDELLA, M.L.C.; SACCHI, C.T.; LANDGRAF, I.M.; ZANELLA, R.C.; BIBB, W.F.; IRINO, K. & GRUPO DE ESTUDO DA FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA - Febre Purpúrica Brasileira. Caracterização rápida das cepas invasoras de *Haemophilus aegyptius*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 31 (4):221-227, 1989.
4. BRENNER, D.J.; MAYER, L.W.; CARLONE, G.M.; HARRISON, L.H.; BIBB, W.F.; BRANDILEONE, M.C.C.; SOTTNEK, F.O.; IRINO, K.; REEVES, M.W.; SWENSON, J.M.; BERKNESS, K.A.; WEYANT, R.S.; BERKLEY, S.F.; WOODS, T.C.; STEIGERWALT, A.G.; GRIMONT, P.A.D.; MCKINNEY, R.M.; FLEMING, D.W.; GHEESLING, L.L.; COOKSEY, R.C.; ARKO, R.J.; BROOME, C.V. and The Brazilian Purpuric Fever Study Group - Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian Purpuric Fever. *J. Clin. Microbiol.*, 26:1524-1534, 1988.
5. BRUUN, B.; CHRISTENSEN, J.J. & KILIAN, M. - Bacteremia caused by a beta-lactamase producing *Haemophilus parainfluenzae* strain of a new biotype. *Acta. path. microbiol. immunol. scand.* Sect. B, 92:135-138, 1984.
6. CARLONE, G.M.; SOTTNEK, F.O. & PLIKAYTIS, B.D. - Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotype III. *J. Clin. Microbiol.*, 22(5):708-713, 1985.
7. DAVIS, D.J.; PITTMAN, M.; & GRIFFITS, J.J. - Hemagglutination by Koch-Weeks Bacillus (*Haemophilus aegyptius*). *J. Bacteriol.*, 59:427-431, 1950.
8. FINEGOLD, S.M. & MARTIN, W.J. - *Diagnostic Microbiology*, 6th ed. St. Louis, Mosby, 1982. p.655-656.
9. IRINO, K.; LEE, I.M.L.; KAKU, M.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; LEVY, C.E.; BERKLEY, S.E.; FLEMING, D.W.; SILVA, G.A.; & HARRISON, L. - Febre Purpúrica Brasileira: resultados preliminares da investigação etiológica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 29(3):174-177, 1987.
10. KAMME, C. - Biotypes of capsulated and non-capsulated *Haemophilus influenzae*. Correlation between biotypes and B-lactamase production. *Acta. path. microbiol. scand.* Sect. B, 88:261-264, 1980.
11. KILIAN, M. - A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. The porphyrin test. *Acta. path. microbiol. scand.* Sect. B., 82:835-842, 1974.
12. 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.
13. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. *Diagnostic microbiology*. 4th ed. Filadelfia, J.B. Lippincott CO, 1992, p. 94-100.

14. LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. - *Haemophilus influenzae* isolados de líquido cefalorraquidiano - Frequência dos biotipos e sorotipos. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, **51**:87-91, 1991.
15. LANDGRAF, I.M.; VIEIRA, M.F.P. - Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* from patients with meningitis in the city of São Paulo, Brazil. *J.clin.Microbiol.* **31**:743-745, 1993.
16. MCGOWAN Jr, J.E.; KLEIN, J.O.; BRATTON, L.; BARNES, M.W.; & FINLAND, M. - Meningitis and bacteremia due to *Haemophilus influenzae*: occurrence and mortality at Boston City Hospital in 12 selected years 1935-1972. *The J.Infect.Disease*, **130**:119-123, 1974.
17. WALLACE Jr, R.J.; MUSCHER, D.M.; MARTIN, R.P.; *Haemophilus influenzae pneumoniae* in adults. *Am.J.Med.* **64**:87-92, 1978.
18. WARD, J. - Prevention of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: lesson from vaccine efficacy trials. *Vaccine*. **9**(Suppl.) S1-S48, 1991.

Recebido para publicação: 29.03.94

USO DE TAMIS NA IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS HISTOLÓGICOS EM IOGURTES COM POLPA DE FRUTA(S) *

Márcia Dimov NOGUEIRA**
Regina M. Morelli S. RODRIGUES**

RIALA6/768

NOGUEIRA, M.D. & RODRIGUES, R.M.M.S. - Uso de tamis na identificação de elementos histológicos em iogurtes com polpa de fruta(s). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54 (2): 93-6, 1994.

RESUMO: Comparou-se a eficiência de dois métodos empregados na análise microscópica para identificação dos elementos histológicos em iogurtes com polpa de fruta(s). Os métodos utilizados foram: A - desengorduramento seguido de hidrólise alcalina a 5% e B - uso do tamis USBS 230 e água filtrada a 35°C. Foram analisadas 30 amostras de iogurtes com polpa de fruta(s) de diferentes sabores, simples ou combinados, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo. O método B foi mais eficiente por permitir boa visualização do material e caracterização das frutas em 96,7% das amostras, assim como, avaliar a qualidade da polpa de fruta. O Método B, por ser mais rápido, simples e preciso e por não utilizar reagentes tóxicos, mostrou-se mais adequado para a identificação histológica de vegetais em iogurtes com polpa de fruta(s).

DESCRIPTORIOS: iogurte com polpa de fruta(s), identificação de elementos histológicos, análise microscópica.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o iogurte apresenta uma tendência de crescimento de produção e apesar da grande popularidade, é recente a legislação² que estabelece a denominação de iogurtes com polpa de fruta(s), sendo classificado comercialmente como iogurte batido⁴.

Tecnologicamente, o iogurte com polpa de fruta(s) é caracterizado pelo alto teor de sólidos, teor de gordura padronizado, podendo-se adicionar de 12% a 18% de açúcar para melhorar o sabor e a consistência. A adição da polpa de fruta ao iogurte é feita numa etapa final, após a fermentação e o rompimento do coágulo, sendo então embalado e armazenado em câmara fria⁴.

A legislação em vigor¹ estabelece dois itens relacionados à análise microscópica: a caracterização e a condição higiênica do produto. Na caracterização, determina-se a genuinidade do produto, ou seja, a

identificação histológica dos constituintes vegetais. Assim como para a identidade, verifica-se também a fraude, intencional ou não, que é a substituição total ou parcial de um componente ou outro.

Para a identificação histológica dos constituintes vegetais, principalmente quando triturados ou moídos, além do conhecimento e experiência do analista quanto aos aspectos morfológicos e histológicos⁹, também devem-se utilizar métodos que proporcionem a obtenção de material adequado para boa visualização ao microscópio ótico¹⁰.

O elevado teor de sólidos e o alto grau de trituração das frutas dos iogurtes com polpa de fruta(s) têm acarretado demora e dificuldade na identificação dos vegetais característicos desses produtos, quando se utiliza o método de desengorduramento seguido de hidrólise alcalina¹². Este problema aliado à demanda de trabalho de um laboratório de prestação de serviço e à exposição do analista à reagentes in-

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

flamáveis e tóxicos foram fatores preponderantes na busca de alternativa para agilizar o preparo das amostras para análise microscópica, melhorar a qualidade do processo e assegurar melhores condições de trabalho ao analista.

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiências do uso do tamis USBS 230 e da técnica de desengorduramento e hidrólise alcalina na caracterização dos vegetais presentes nos iogurtes com polpa de fruta(s) e propor mudança de metodologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 30 amostras de iogurte com polpa de fruta(s), de diferentes sabores, simples e misturados, de 8 marcas, adquiridas na cidade de São Paulo - SP, contendo de 1 a 5 tipos de frutas.

Método

As amostras utilizadas em cada método foram retiradas da mesma embalagem, após a homogeneização do produto.

Método A - Foi utilizado o método descrito por Zamboni et alii¹², de uso corrente na Seção de Microscopia Alimentar, caracterizado por 3 etapas principais: desidratação com álcool etílico, desengorduramento com éter etílico e hidrólise com solução de hidróxido de sódio a 5%.

Método B - Método da tamisação para iogurtes com polpa de fruta(s)

Material

Béquer de 200 ml
Equipamento para filtração a vácuo
Espátula de metal
Microscópio estereoscópico
Microscópio ótico
Papel de filtro qualitativo
Tamis USBS 230

Reagente

Água filtrada a 35°C
Água glicerinada a 2%

Procedimento

Após homogeneização, pesar 100 g da amostra em um béquer de 200 ml. Verter a amostra, em pequenas quantidades, no tamis USBS 230, lavando-a com jatos de água filtrada a 35°C. Lavar as paredes do béquer com água filtrada a 35°C, transferindo-a para o tamis, até remover a amostra aderida ao recipiente. Repetir o procedimento de lavagem até o resíduo apresentar-se limpo. Filtrar o material retido

no tamis, a vácuo sobre papel de filtro, lavando o tamis com água filtrada até remover todo o resíduo. Transferir o papel de filtro para uma placa de Petri e observá-lo ao microscópio estereoscópico, aumento de 20 x, para identificar e quantificar matérias estranhas. Retirar com espátula de metal, pequenas porções do material retido no papel e montar sobre lâmina com água glicerinada a 2%. Examinar ao microscópio ótico, aumento de 100 a 400 x, e identificar os elementos histológicos característicos e estranhos ao produto.

Identificação Histológica

Os elementos histológicos característicos das frutas presentes nos iogurtes foram identificados a partir do conhecimento específico do analista, de comparações com padrões e leituras especializadas^{7,8,11}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação dos métodos considerou-se os seguintes critérios:

- Exposição do analista aos reagentes - foram considerados os tipos de reagentes e os tempos determinados pelos métodos.
- Tempo de preparo da amostra - tempo gasto para eliminar material interferente.
- Tempo de leitura - tempo gasto na observação microscópica para identificação dos elementos histológicos característicos das frutas.
- Qualidade da leitura - caracterizada pela visibilidade adequada do material em lâmina.

No Método A, o tempo gasto para desengorduramento variou entre as amostras e não foi inferior à 1 hora. Nesta etapa trabalhou-se com éter etílico, que pode causar irritação moderada de pele e das membranas mucosas, além de outros problemas, quando em doses altas⁶. Outro solvente utilizado nessa etapa foi o etanol (álcool absoluto), que pode causar vários efeitos tóxicos como náusea, vômito etc⁶. Após o desengordu-

TABELA 1

Comparação dos métodos A e B para identificação de elementos histológicos em iogurtes com polpa de fruta (s).

Método	Reagente usado	Tempo de preparo	Tempo de leitura
A	álcool éter etílico hidróxido de sódio	1h e 40 min.	60 min.
B	água filtrada água glicerinada	10 min.	5 a 15 min.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - 1994

ramento, procedeu-se à hidrólise alcalina e o material foi levado à ebulição seguido de filtração à quente, sendo que o tempo gasto foi de 40 minutos (Tabela 1).

Segundo método descrito por ZAMBONI et al¹², após a hidrólise, o material deve ser esfriado e, então, filtrado. Como a filtração do material a frio foi dificultada devido a formação de uma camada gelatinosa sobre o papel de filtro, optou-se pela filtração a quente, onde foi possível filtrar todo o material hidrolisado. Porém, a filtração a vácuo do material hidrolisado aquecido expõe o analista diretamente aos vapores tóxicos, podendo causar desde uma irritação das mucosas do sistema respiratório até uma pneumonite grave³.

O uso do tamis USBS 230 (Método B) eliminou os reagentes de risco e a lavagem do material com água quente foi feita em cerca de 10 minutos (Tabela 1).

Enquanto no Método B, o tempo de leitura da lâmina para identificação do elemento histológico característico variou de 5 a 15 minutos (Tabela 1), dependendo do número de frutas adicionadas, no Método A, o tempo mínimo foi de 1 hora. Pela dificuldade de identificação de determinados elementos histológicos, não foi anotado o tempo máximo de análise. Optou-se pela observação sistemática de várias lâminas do material obtido por esse método, onde ocorreram, inclusive, situações nas quais o elemento histológico vegetal não foi identificado.

Na observação do material obtido pelo Método A, ao microscópio estereoscópico, foi mais difícil visualizar os fragmentos vegetais, devido ao alto teor de resíduo (material interferente) e, em alguns casos, as estruturas celulares desses fragmentos, como os rafideos de *Ananas sativus* (abacaxi), mostraram-se dilaceradas ao microscópio ótico, sendo que o mesmo não ocorreu com o material obtido pelo Método B.

Pelo Método A, verificou-se que 36,7% (Figura 1) das amostras apresentaram boa qualidade de leitura

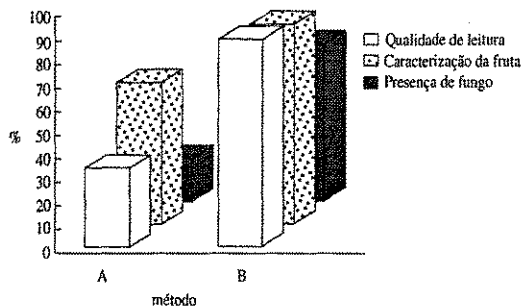


FIGURA 1

Percentagem de amostras analisadas quanto à qualidade de leitura, caracterização da(s) fruta(s) e presença de fungos. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - 1994.

ra. No restante, a presença de matérias interferentes dificultou a identificação dos elementos histológicos característicos das frutas. Foi possível a caracterização das frutas em 66,7% das amostras analisadas (Figura 1). Na leitura das lâminas deste material, foi observada a presença de poucas estruturas celulares da fruta e, na maioria, apenas o elemento histológico característico. A facilidade de identificação ocorreu nos iogurtes sabores morango (*Fragaria vesca*), framboesa (*Rubus idaeus*) e amora (*Rubus sp*), pelas próprias características dos frutos¹¹.

Quando o elemento histológico das frutas correspondia à estrutura morfológicamente mais delicada ou presente em pequena proporção, como célula de mesocarpo, tubo de látex, pêlo, célula de tanino e outros^{7,11}, o material interferente dificultou ou impossibilitou a visualização e, conseqüentemente, a identificação.

A presença de material interferente, resultante das amostras tratadas pelo Método A, pode ser conseqüência da integração dos seguintes fatores: desengorduramento insuficiente, pois de acordo com o método deve-se repetir a etapa de desengorduramento até a retirada da maior parte das substâncias gordurosas do produto, o que nem sempre ocorreu; hidrólise alcalina incompleta⁵, pelo curto tempo de aquecimento e baixa temperatura; e, pelas próprias características do produto⁴ que possui elevado teor de sólidos (15% de extrato seco desengordurado), muitas vezes aumentado para dar consistência ideal ao produto.

O uso do tamis USBS 230 permitiu boa visualização do material em lâmina em 100% das amostras analisadas, sendo que em 96,7% (Figura 1) foram caracterizadas as respectivas frutas. Isto se deve à eliminação dos sólidos menores que 0,062 mm e à retenção dos elementos histológicos vegetais sem impregnação de partículas gordurosas ou proteicas devido a lavagem a quente. Além do elemento histológico característico, pode-se observar um maior número de estruturas do fruto em estudo, o que incrementou a eficácia da análise.

Nas lâminas obtidas do material tamisado, sem material interferente, também foi possível observar grande quantidade de hifas nas estruturas celulares das frutas em 70% das amostras, indicando a adição de matéria-prima avariada. Esta etapa também deve ser considerada um ponto crítico de controle, uma vez que, após a adição da polpa, o produto será envasado e resfriado. Se essas hifas estiverem mortas, sugere-se estipular um limite de tolerância neste tipo de produto, caso contrário, o risco de qualquer alteração de temperatura nas etapas subsequentes de transporte ou armazenamento comercial acarretará conseqüências mais graves à saúde. Pelo Método A verificou-se a presença de fungos somente em 26,7% das amostras.

Os dois métodos permitiram a visualização de gomas, na observação do material em lâmina e identificadas através da comparação com padrões, naqueles produtos com especificação de espessantes na rotulagem.

CONCLUSÕES

Na comparação entre os dois métodos utilizados na identificação histológica de iogurtes com polpa de fruta(s) pode-se concluir que o uso do tamis USBS 230:

- 1 - Apresentou melhor qualidade de leitura do material ao microscópio.
- 2 - Aumentou a eficiência da identificação histológica e, conseqüentemente, a caracterização da(s) fruta(s).
- 3 - Possibilitou a identificação de matérias estranhas e melhor observação de hifas nas estruturas celulares das frutas.
- 4 - Permitiu maior rapidez na análise microscópica.

Sob o aspecto analítico e de segurança do analista, propõe-se o uso do tamis USBS 230 na análise microscópica de iogurtes com polpa de fruta(s).

RIALA6/768

NOGUEIRA, M.D. & RODRIGUES, R.M.M. - The hystological identification in yogurts containing fruit pulp by using sieve USBS 230. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 93-6, 1994.

ABSTRACT: The efficiency of two methods for hystological identification was compared, by using 30 samples of yogurts containing different flavors of fruits pulps. Method A used defatting and alkaline hydrolysis and Method B used sieve USBS 230 and filtered water at 35°C. The Method B was superior to Method A by making possible a good visualization of the material and characterization of fruits in 96,7% of samples. In both methods, it was also possible to evaluate the quality of fruit pulp. Since the Method B is rapid, simple and precise and does not require toxic reagents, it is considered to be the most suitable for hystological identification in yogurts containing fruit pulp.

DESCRIPTORS: yogurts containing fruit pulp, hystological identification, microscopy methods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. *Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*. Aprovado pelo decreto nº 30.691 de 23-3-52, alterado pelo decreto nº 1.255 de 25-6-62. Brasília, DIPOA, 1980. p.115.
2. BRASIL. SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Portaria nº 02 de 10 de abril de 1985. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 set. 1985. Seção 1, pt 1, p.6052.
3. FUNDACENTRO, Ministério do Trabalho. Ficha de orientação para produtos químicos. São Paulo, 1981.
4. GRANDI, J.G. - Leites fermentados, manteiga e queijos. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A. & BORZANI, W. - *Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo, Edgard Blucher, 1983. (Série Biotecnologia, 5), p. 124-30.
5. LEHNINGER, A.L. - *Componentes moleculares das células*. São Paulo, Edgard Blucher, 1976. p.71.
6. MERCK AND COMPANY. *The Merck Index*. Rahway, N.J. 11 ed., 1989, p.594 e 600.
7. MENEZES JUNIOR, J.B.F. - Investigação sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9:18-77, 1949.
8. MENEZES JUNIOR, J.B.F. - A investigação microscópica de sementes oleaginosas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 18:26, 1958.
9. SCHULZC, A.E. - Applied histology of foods and drugs material. In: *FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Microscopic-analytical methods in foods and drug control*, Washington, D.C. FDA, 1960. (Techin. Bull. nº 1), p. 209-20.
10. WALLIS, T.E. - *Microscopia analítica: sus fines, y metods in relacion a los alimentos, agua, especias y medicamentos*; trad. por J.G. Berenguer, Zaragoza, Acribia, 1968. p. 24-5.
11. WINTON, A.B. & WINTON, K.B. - The structure and composition of foods. New York, John Wiley, 1939. v.2, p.102-803.
12. ZAMBONI, C.Q. et ali. *Manual de análise microscópica de alimentos*. São Paulo, 1986. p. 18-9 (apostila mimeografada).

Recebido para publicação: 4.4.94

CONTROLE DE ESTERILIDADE DE SOLUÇÕES PARENTERAIS DE GRANDE VOLUME UTILIZADAS NA REDE HOSPITALAR DA CIDADE DE SÃO PAULO*

Otília Ferreira NOVO**
Mariangela Tírico AURICCHIO**

RIALA6/769

NOVO, O.F. e AURICCHIO, M.T. - Controle de esterilidade de soluções parenterais de grande volume utilizadas na rede hospitalar da cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 97-101, 1994.

RESUMO: Foi estudado o problema da contaminação de Soluções Parenterais de Grande Volume (SPGV), cujo uso em hospitais destina-se a manter o equilíbrio líquido e eletrolítico do sistema circulatório e fornecer calorías ao paciente. No período de 1989 a 1993 foram analisadas quanto ao controle de esterilidade, 582 amostras de Soluções Parenterais de Grande Volume produzidas pela indústria farmacêutica nacional e por farmácias hospitalares. Os resultados obtidos revelaram que 9,62% das amostras analisadas foram reprovadas nos testes de esterilidade, tendo sido encontradas amostras aprovadas e reprovadas num mesmo lote, fato observado para soluções acondicionadas em frascos plásticos.

DESCRITORES: Soluções Parenterais de Grande Volume; Controle de esterilidade, Alimentação Parenteral, Contaminação microbiana.

INTRODUÇÃO

Soluções parenterais de grande volume são soluções de uso endovenoso e dose única, acondicionadas em frascos de vidro ou plástico contendo 100 ml ou mais da preparação farmacêutica^{1,2 e 10}.

Estas soluções têm por finalidade a manutenção do equilíbrio líquido e eletrolítico do sangue, além da ação energética fornecedora de calorías.

O volume e a composição dos fluidos orgânicos variam muito de um compartimento para outro e de um tipo de célula para outra do organismo e devem ser mantidos constantes apesar das vicissitudes da vida diária e de situações de stress impostas pelas enfermidades. Distúrbios nestes fluidos e no metabolismo eletrolítico envolvem quatro propriedades: volume-osmolaridade-pH e concentração de íons específicos⁵. Em muitas doenças e estados anormais

do organismo ocorrem variações nessas propriedades orgânicas⁵.

Num paciente em situação de emergência, de deficiência de volume sanguíneo, a providência inicial do ponto de vista terapêutico é a pronta aplicação de solução isotônica de NaCl 0,9%, que não apresenta qualquer tipo de contra-indicação⁵. Subseqüentemente deve ser observado o equilíbrio ácido-básico e para tanto utiliza-se também do recurso da administração de solução parenteral.

Nas últimas décadas foi desenvolvida a hiper-alimentação intravenosa⁵ que agora representa uma importante contribuição no tratamento de certos pacientes, particularmente aqueles com anormalidades intestinais, cólera ou outras disfunções severas, traumas ou várias complicações cirúrgicas tanto em adultos como em crianças. O sucesso destes procedimentos, justifica seu uso, mas as complicações são

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

sérias e devem ser seguidas somente com a atenção meticulosa por parte dos farmacêuticos, enfermeiros e médicos.

O volume a ser empregado e a via de administração dão a noção exata da responsabilidade pela qualidade destes produtos⁸. A verificação da esterilidade e pirogênio de tais produtos é imprescindível e fundamental dentro do Controle de Qualidade de Medicamentos.

Os métodos de esterilização mais comumente empregados são os seguintes:

- *esterilização a vapor sob pressão* desde que os princípios ativos da solução e a embalagem plástica que as contém, resista a este tipo de tratamento.^{3,8}
- *esterilização a vapor fluente* é o método mais utilizado na indústria, normalmente é repetido por três vezes consecutivas para garantia da eficácia da esterilização.
- *calor seco (esterilização em estufa utilizando ar forçado)* que pode ser empregado porém com cuidados, para evitar problemas como a caramelização em soluções de glicose, que pode ocorrer também quando a solução é resfriada muito rapidamente.³

A degradação química é particularmente importante para as SPGV face ao processo de esterilização utilizado. Os carboidratos sob condições de aquecimento que venham a sofrer caramelização resultam em produtos que podem ser potencialmente tóxicos⁴.

Quando a produção das SPGV se dá em pequena escala, como é o caso das farmácias hospitalares, estas soluções geralmente são esterilizadas por *filtração*⁸. Este tipo de esterilização deve seguir rígidos controles de qualidade segundo preconiza o FDA (1985), devendo ser utilizadas membranas de 0,45 µm de porosidade para uma filtração preliminar. A partir de 1960 passou a ser recomendada membrana de 0,22 µm de porosidade com repetição da filtração após 24 horas³. Este tipo de esterilização é empregado também quando a preparação não pode sofrer outro tratamento esterilizante. As SPGV devem ainda estar isentas de partículas em suspensão⁴.

Para assegurar-nos da eficiência da esterilização devemos estabelecer documentos de validação apropriados para cada tipo de esterilização, que evidenciem alto grau de segurança de que o processo produzirá, efetivamente, um produto com as características de qualidade dentro de critérios específicos pré-estabelecidos⁹.

O controle da esterilização deve ser feito com o emprego de Indicadores Biológicos (IB) ou "paper strips" (USP - NF 1987), que são tiras carreadoras de microrganismos de alta resistência, segundo o tipo

de esterilização a ser monitorado. Estes indicadores colocados estrategicamente nos equipamentos esterilizadores, dentro ou fora das embalagens, certificarão a eficiência do processo empregado⁶.

Os microrganismos comumente utilizados são: *Bacillus subtilis var. niger* para a esterilização por aquecimento a seco e *Bacillus stearothermophilus* para os vários tipos de esterilização a vapor.

Devemos lembrar que concluído o processo de esterilização, o produto esterilizado deve manter sua condição estéril, se o acondicionamento for adequado. Placencia e Oxborrow (1984-1986) desenvolveram uma série de testes de avaliação da integridade da biobarreira de embalagens para assegurar que o material utilizado realmente manterá a esterilidade do produto⁶.

Outro fator de importância a ser levado em conta quando se trata de SPGV é o *acondicionamento*.

Frasco de vidro é o material ideal para acondicionamento, pois oferece garantias maiores para a manutenção da qualidade do produto pelas características próprias do vidro; contudo razões de ordem econômica têm levado à utilização do plástico.

São empregados frascos plásticos que devem se enquadrar dentro de especificações físicas, mecânicas, térmicas, elétricas e físico-químicas de tal modo a serem inócuos e não cederem produtos tóxicos, bem como serem inertes em relação aos princípios ativos que acondicionam. Além de todas estas propriedades é imprescindível que haja suficiente impermeabilidade do material a microrganismos (biobarreira), vapores e gases⁷.

Os plásticos mais utilizados são: polietileno de baixa pressão e alta densidade que pode ser aquecido a 120°C sem alteração e com possibilidade de serem autoclavados⁷. O polietileno costuma ser revestido por outros polímeros afim de torná-lo menos permeável.

Utiliza-se também o polipropileno que é mais leve e menos permeável, porém mais opaco (o que não é desejável), ainda que resista bem à autoclavagem.

É importante ressaltar que os frascos plásticos apresentam microporos em sua estrutura. Quando há empilhamento excessivo, devido à ação do peso, ocorrem vazamentos através do rompimento de tais microporos resultando das contaminações que levam à perda da esterilidade do produto.

Outro ponto crítico dos frascos plásticos é o bico, pois no momento de sua vedação nem sempre o processo se realiza com a eficiência desejada, acarretando mais uma possibilidade de perda da esterilidade.

O presente estudo teve por objetivo avaliar as condições de esterilidade das SPGV que são colocadas em nossa rede hospitalar, muitas vezes em condições impróprias para o consumo.

Tal estudo também foi realizado em função de já termos realizado trabalho semelhante considerando a presença de Pirogênio em tais soluções.

Importante é aqui considerar o alto risco para pacientes hospitalizados e já debilitados, que fazem uso dessas soluções, levando-se em conta o grande volume que é injetado.

Nosso intuito foi o de realizar o Controle de Esterilidade dessas soluções para observar a porcentagem de amostras não estéreis, impróprias para o consumo, observando ainda que muitas soluções condenadas, por apresentarem crescimento evidente a olho nú ou observação macroscópica, revelaram frascos de mesmo lote com amostras absolutamente estéreis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 582 amostras encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz pelos Serviços de Vigilância, por Hospitais da Rede Pública e Particular e pelos próprios laboratórios fabricantes.

Trataram-se de amostras de lotes dos principais laboratórios especializados em Soluções Parenterais de Grande Volume (SPGV) que abastecem a rede hospitalar de São Paulo, como também amostras produzidas em Farmácias Hospitalares.

Quanto à composição, as 582 amostras analisadas foram assim distribuídas:

Amostras	Quantidade
Solução de glicose a 5%	209
Solução hipertônica de glicose	43
Solução fisiológica	116
Solução glicofisiológica	23
Solução de nutrição parenteral(NP)	89
Solução de diálise peritoneal a 1,5%	31
Solução Ringer com lactato	30
Outros	41

Procedimento

As amostras foram verificadas quanto ao Controle de Esterilidade de acordo com a técnica descrita na Farmacopéia Brasileira III edição.

Essas análises foram realizadas em condições adequadas de trabalho, sendo efetuadas em sala especial com capela de fluxo laminar.

O método utilizado foi o de Filtração por Membrana realizada em filtros Milipore.

Meios de Cultura empregados

Meio de Tioglicolato Fluído pH 7,1 ± 0,2

Meio de Caseína - Soja pH 7,3 ± 0,2

Fluído A - Pepsina a 0,1% pH 7,1 ± 0,2

Equipamentos

Câmara de Fluxo Laminar Vertical

Unidade suporte para filtros

Pinças e tesouras especiais, estéreis

Filtros de membrana de 0,45 µm de porosidade, 47 mm de diâmetro, estéreis.

Filtrou-se 500 ml de cada frasco através de duas membranas filtrantes. A seguir, as mesmas foram lavadas com fluído A, removidas assepticamente, cortadas ao meio e semeadas, cada metade em 100 ml do meio de Caseína-Soja e em 100 ml de meio de Tioglicolato fluído respectivamente. Os meios de Caseína-Soja foram encubados à 20-25°C e os meios de Tioglicolato à 30-35°C ambos por 10 dias.

Paralelamente foram realizados controles positivos usando-se *Bacillus subtilis* (ATCC 10931) e *Aspergillus niger*, para controle da viabilidade dos meios de cultura empregados.

RESULTADOS

Os resultados das análises obtidos no período estudado, são mostrados na tabela 1.

TABELA 1

Distribuição da freqüência dos resultados de análises em soluções injetáveis de grande volume segundo o período entre 1.989 a 1.993. Instituto Adolfo Lutz - São Paulo

Período	Total analisado	Amostras em desacordo
1.989	188	20
1.990	74	2
1.991	140	10
1.992	112	17
1.993	68	7
Total	582	56

O fluxo de recebimento de amostras de Soluções Parenterais de Grande Volume no período estudado pode ser observado no gráfico 1.

Os dados relativos ao resultado das análises, segundo tipo de solução parenteral de grande volume estudados são representados na tabela 2.

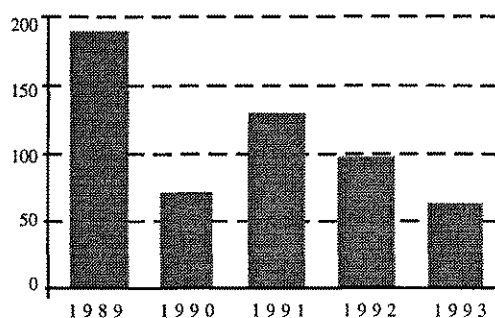


GRÁFICO 1

Fluxo de envio das amostras para o laboratório segundo período, 1.989 a 1.993. Inst. Adolfo Lutz-S.Paulo.

TABELA 2

Distribuição da freqüência dos resultados de análises em soluções injetáveis de grande volume segundo o período entre 1.989 a 1.993. Instituto Adolfo Lutz - São Paulo

Tipo	Total analisado		Amostras em desacôrdo	
	N.	%	N.	%
a- Soluções de glicose 5%	209	35,9	21	37,5
b- Solução Hipertônica deglicose	43	7,4	8	14,3
c- Solução fisiológica	116	19,9	6	10,7
d- Solução glicofisiológica	23	4,0	4	7,1
e- Solução de N.P.	89	15,3	12	21,4
f- Solução de diálise peritonial 1,5%	31	5,3	2	3,6
g- Solução de Ringer com Lactato	30	5,2	0	0,0
h- Outros	41	7,0	3	5,4
Total	582	100,0	56	100,0

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram que 9,62% das amostras analisadas foram reprovadas nos testes de controle de esterilidade, índice bastante elevado se levarmos em conta a via de administração (endovenosa) o que significa que uma solução nessas condições de contaminação representa uma carga microbiana colocada diretamente na corrente circulatória do paciente.

Observa-se dos dados da tabela 1 e da figura 1, que não ocorre, infelizmente uma monitorização sistemática deste tipo de medicamento por parte dos órgãos de Vigilância Sanitária, em consequência disto deu-se a variação observada no número de amostras recebidas para análise.

Os dados obtidos mostram números muito importantes do ponto de vista Sanitário. Esse tipo de medicação exige, dadas suas peculiaridades, controles rígidos de fabricação, onde o processo de produção

deve ser executado em obediência às Boas Práticas de Fabricação, daí a importância das inspeções, às indústrias farmacêuticas e farmácias hospitalares por equipes da Vigilância Sanitária, serem sistematizadas, onde as condições de instalação, produção e procedimentos comprometedores do produto seriam inventariados pelas equipes, compondo assim juntamente com a análise laboratorial a monitorização da qualidade das SPGV.

Dentre as características das instalações e procedimentos mais importantes a serem observados está a qualidade de água a ser utilizada.

A água deve ser destilada ou então submetida a processo de osmose reversa, pois não é recomendado para preparação das SPGV o uso da água deionizada, visto que os cartuchos dos deionizadores podem eliminar substâncias que iriam contaminar quimicamente a água assim obtida.

Quanto à filtração, também apresenta o inconveniente de partículas serem eliminadas dos filtros, o que é absolutamente indesejado pois podem acarretar problemas em grandes cirurgias, como cardíacas e renais.

Ainda que tenham sido fabricados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, alguns produtos podem em função de más condições de transporte e armazenamento (já nos hospitais) apresentar problemas de crescimento microbiano em decorrência da quebra da biobarreira anteriormente mencionada, além do problema da efetiva vedação dos frascos plásticos na hora do enchimento, situações que podem explicar o fato de que num mesmo lote, terem sido encontradas amostras com crescimento evidente e outras em condições de esterilidade adequadas. Estas observações corroboram com o fato de que as embalagens plásticas apresentam limitações importantes em relação à embalagem de vidro ainda que sobre a primeira haja o aspecto financeiro favorável.

Observando-se os dados da tabela 2 verificamos que as soluções glicosadas (a,b e d) apresentam maior índice de amostras impróprias ao consumo (58,9%, em relação ao total de reprovações) sendo importante aqui considerar além do problema da embalagem plástica utilizada, a própria natureza dessas soluções que apresentam condições bastante favoráveis ao desenvolvimento microbiano. Essas soluções são as que apresentam maior número de amostras com crescimento evidente de fungos e leveduras em alguns frascos e amostras estéreis em frascos de mesmo lote.

Outro índice bastante elevado de contaminação ocorre nas soluções de nutrição parenteral (21,4% em relação ao total de reprovações). É importante ressaltar que a maioria dessas soluções são produzidas nas Farmácias Hospitalares, com composição bastante complexa e variável (para atender às neces-

sidades específicas dos pacientes) com alta porcentagem de glicose, aminoácidos, sais de sódio, potássio e magnésio, polivitaminas, ácido fólico e oligoelementos. Esta complexidade resulta numa maior dificuldade na sua produção por ser necessária área estéril para a fabricação, o que nem sempre é possível dentro de uma Farmácia Hospitalar. Contudo é importante que a Farmácia Hospitalar tenha condições de prepará-las de acordo com as Boas Práticas de Fabricação para que possa atender assim, à demanda com alto grau de individualização da prescrição, que as soluções de nutrição parenteral apresentam.

A maioria dessas soluções são de uso pediátrico e tem sido muito frequente o aparecimento de problemas em crianças hospitalizadas, principalmente recém-nascidos, que fazem uso desta medicação.

Com relação aos produtos industrializados nota-se que nos últimos anos os Laboratórios Farmacêuticos passaram a se preocupar com o ponto crítico das indústrias que é a área de preparação das SPGV. Os investimentos foram grandes no sentido de se enquadra-

rem dentro das boas práticas de fabricação, o que tem acarretado melhoras sensíveis na qualidade do produto.

É importante também considerar o período mínimo de estocagem de 30 dias em condições normais e a 20°C. Após esse período, novos controles de esterilidade devem ser efetuados antes desses produtos serem liberados para a venda. Cuidados com o transporte, acompanhamento da estocagem do produto nos almoxarifados hospitalares observando se não ocorre empilhamento excessivo dos frascos são práticas que asseguram a qualidade do produto até o momento do uso no paciente.

No entanto os problemas oriundos das embalagens, transportes e armazenamento continuam. Existem laboratórios que mantêm fiscalização na armazenagem de seus produtos mesmo depois de colocados no almoxarifado do hospital, mostrando preocupação com a qualidade com que o produto chega ao paciente.

As indústrias menores têm muito mais dificuldades, obviamente por problemas de ordem financeira.

RIALA6/769

NOVO, O.F. and AURICCHIO, M.T. - Control of sterility in great volume parenteral solutions used in hospitals in the city of São Paulo *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 97-101, 1994.

ABSTRACT: This surveillance intend to show up the conditions of sterility from commercially prepared great volume parenteral solutions used in hospitals to keep and restore the volume and composition of the body fluids to normal. An amount of 582 samples manufactured at industries and at hospital pharmacies were analise from 1989 to 1993. The results had shown 9,62% of the total samples didn't meet the requirements of sterility and within the same batch different samples gave different results concerning sterility.

DESCRIPTORS: Great volume parenteral solutions, parenteral nutricion, contaminacion of.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITISH PHARMACOPEIA London, Her Majesty's Stationery Office, A191-5, 1988.
2. FARMACOPÉIA BRASILEIRA III ed., São Paulo, Organização Andrei Editora, 964-73, 1977.
3. GARDNER, J.F. and PEEL, M.M. Introduction to Sterilization, Desinfection and Infection Control 2nd ed. Melbourne, Churchill-Livingstone, 264p, 1991.
4. LEVY, R.V. and LEAHY, T.J. in BLOCK, S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation 4th ed. Edited by Seymour S. Block Florida, 527-52, 1991.
5. MUDGE, G.H. and WEINER, I.M. in GOODMAN AND GILMAN's The Pharmacological Basis of Therapeutics 8 th ed. Dallas Pergamon Press, 682-707, 1990.
6. OXBORROW, G.S. and BERUBE, R. in BLOCK, S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation 4th ed. Edited by Seymour S. Block Florida, 1047-57, 1991.
7. PRISTA, L.N.; ALVES, A.C. e MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica II ed. Lisboa Fundação Kalouste Gulbenkian, Vol. 3, 2155-84, 1981.8. PRISTA, L.N.; ALVES, A.C. e MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica III ed. Lisboa Fundação Kalouste Gulbenkian, Vol. 1,670-7 e 440-1, 1986.
9. RUSSEL, A.D. in BLOCK, S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation 4th ed. Edited by Seymour S. Block Florida, 29-58, 1991.
10. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII ed. Rockville United States Pharmacopeial Convention, INC, 1483-8, 1990.

Rcebido para publicação: 14.04.94

METODOLOGIAS PARA CONTROLE DA ADEQUAÇÃO DE EMBALAGENS PARA ÁGUA MINERAL*

Lúcia Tieco Fukushima MURATA**
Maria Cecília Depieri NUNES**
Maria Rosa da Silva de ALCÂNTARA**
Neus Sadocco PASCUET**
Vera Helena Machado de MINAS**

RIALA6/770

MURATA, L.T.F.; NUNES, M.C.D.; ALCÂNTARA, M.R.S.; PASCUET, N.S. & MINAS, V.H.M. - Metodologias para controle da adequação de embalagens para água mineral. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 102-6, 1994.

RESUMO: Foram analisadas 146 amostras de embalagens utilizadas no acondicionamento de águas minerais, no período de 1983 a 1993, segundo os testes contidos nas Resoluções 13/75 e 45/77 da legislação brasileira. Constatou-se que todas as amostras analisadas segundo a Resolução 45/77 foram aprovadas, enquanto que, quando avaliadas conforme a Resolução 13/75, 15% foram condenadas. Destas, o material com maior índice de rejeição foi o poliestireno. Sugere-se neste trabalho que sejam mantidos, os testes específicos previstos na Resolução 13/75 que não constam dos regulamentos técnicos do MERCOSUL.

DESCRITORES: embalagens para águas minerais. Características organoléticas. Migração total de substâncias orgânicas, minerais. Permeabilidade.

INTRODUÇÃO

Água mineral natural pode ser definida como uma água de origem profunda, de fonte natural ou artificialmente captada, não sujeita à influência de águas superficiais⁶. Deve ser também uma água bacteriológicamente sadia, muitas vezes apresentando propriedades medicinais, rica em oligoelementos, com composição química ou propriedades físico-químicas distintas das águas comuns⁹. Face a esta diversidade de composição química e a fim de preservar as suas propriedades, tornou-se necessário exigir dos materiais em contato com água mineral, critérios de qualidade indiscutíveis¹⁷. Segundo o artigo 4.2.3 da Resolução 25/76, que estabelece padrões de identidade e qualidade para as águas mineirais e água natural da fonte, as águas minerais, quando envasadas, devem apresentar composição química sensivelmente idêntica à indicada para a água emergente da fonte correspondente⁶.

Estas características especiais fazem com que no Brasil os materiais que entram em contato com águas minerais estejam sujeitos a duas regulamentações, no que concerne à suas embalagens: a Resolução 45/77⁸, que estabelece critérios para avaliação da adequação de embalagens para alimentos, através da determinação da migração global, arsênio e metais pesados no resíduo das provas de cessão e verificação das características organoléticas dos solventes utilizados nos testes, e a Resolução 13/75⁷, que dispõe sobre o acondicionamento de águas minerais ou de mesa, que deverão atender, além dos testes previstos na Resolução 45/77, às seguintes exigências específicas: não alterar as características organoléticas, físicas, físico-químicas, microbiológicas e farmacodinâmicas próprias da água mineral, semelhantes as de legislações internacionais^{3,14}. Existe portanto, uma preocupação maior no controle destas embalagens, quando comparado com as de alimentos.

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

A grande maioria da água mineral comercializada em nosso país é embalada em material plástico, tanto flexível (sacos plásticos) quando rígido (garrafas, bombonas, copos). No grupo das embalagens rígidas estão também incluídos os materiais usados na elaboração de elementos de vedação (selos de alumínio com película plástica, tampas plásticas), que em geral são confeccionados com materiais diferentes daqueles usados na fabricação do corpo e que, portanto, devem ser cuidadosamente selecionados e sofrer o mesmo controle que o recipiente.

Os materiais mais utilizados na fabricação de embalagens rígidas para água mineral são: o policloreto de vinila, poliestireno, polipropileno, polietileno de alta densidade para frascos e bombonas e polietileno de baixa densidade para tampas e filmes. Na elaboração de filmes plásticos laminados a folhas são normalmente usados os mesmos materiais, convenientemente processados. Plásticos suscetíveis de formar filmes com boas qualidades químicas, aplicados sobre folhas de alumínio, papel, papelão ou cartolina, também são empregados.

Qualquer água acondicionada está sujeita a sofrer alterações nas suas características físico-químicas e organolépticas por efeito dos materiais de embalagem. Os plásticos podem ceder elementos de sua formulação para a água, sendo que alguns destes apresentam toxicidade e devem ser controlados, enquanto que outros elementos, apesar de isentos de qualquer efeito tóxico, alteram o odor e sabor da água, podendo ser imperceptíveis no caso de embalagens para alimentos, devido aos odores e sabores característicos dos mesmos¹².

No Brasil, o consumo estimado de água mineral em 1989 foi de 800 milhões de litros por ano (5 litros/habitante), com um crescimento anual de 4%¹⁵. Em 1991, o consumo cresceu para 1,016 bilhões de litros¹⁸. Estes dados sugerem que, apesar da situação econômica que o país vem enfrentando, o setor de águas minerais vem aumentando sua produção.

Considerando que uma das razões do aumento no consumo de água mineral se deve à presença de odor e sabor nas águas de abastecimento, que nem sempre estão dentro dos limites de tolerância, torna-se mais importante o controle das características organolépticas nas águas minerais¹⁸.

Existem controvérsias na legislação européia, brasileira e argentina¹ quanto ao tipo de controle efetuado em embalagens para água mineral. Na França¹³ e na Bélgica⁴, além dos testes exigidos para embalagens de alimentos, faz-se o controle de permeabilidade a gases e a componentes odoríferos, microbiológico, de substâncias orgânicas alheias à composição da água e de elementos minerais.

No Brasil também são efetuados estes testes, constando o de determinação da permeabilidade da embalagem no projeto de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT², com o intuito de verificar a passagem de gases e vapores, através da espessura da parede, além da metodologia utilizada pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB^{10,11}, que visa verificar a quantidade de substâncias orgânicas e minerais passíveis de migrar da embalagem para a água mineral, alterando deste modo suas características próprias.

A Argentina, entretanto, não possui uma legislação específica para o controle de embalagens de águas minerais.

Os regulamentos técnicos MERCOSUL⁵ da área de embalagens, atualmente em discussão e que passarão a vigorar em janeiro de 1995, em substituição à legislação brasileira, não fazem distinção entre embalagens para alimentos e para água mineral, não prevenindo portanto testes complementares para as mesmas.

O objetivo do presente trabalho é fazer um controle da adequação das embalagens para água mineral na última década, verificando-se a importância de manter os testes específicos previstos na Resolução 13/75.

MATERIAL E MÉTODO

No período compreendido entre 1983 e 1993, 146 amostras de embalagens e seus acessórios utilizadas no acondicionamento de águas minerais e de mesa foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz por fabricantes, consumidores e órgãos de fiscalização, a fim de serem submetidas à análise de orientação, fiscal e prévia para registro do produto no Ministério da Saúde.

Estas amostras correspondem à maioria das embalagens para este tipo de finalidade, comercializadas em todo território nacional, e se encontram descritas na tabela 1, de acordo com o tipo de material empregado em sua fabricação e quanto à sua forma de apresentação. Alguns materiais não citados separadamente na tabela 1 e que também são utilizados no acondicionamento de água mineral foram agrupados como outros, e se referem a: polietileno e copolímeros de etileno e acetato de vinila, alumínio e verniz termosselante, poliéster e policarbonato.

Os parâmetros avaliados constam da legislação brasileira, nas Resoluções 13/75 e 45/77, estando a metodologia descrita no Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁶.

No caso de embalagens pigmentadas, foram analisados os pigmentos ou corantes separadamente, para a verificação da presença de arsênio e metais pesados¹⁶.

TABELA 1

Número de amostras analisadas, de acordo com o tipo de material empregado e sua forma de apresentação.

Apresentação	Tipo de material						Total
	PVC	PS	PET	PP	PE	Outros	
Garrafas	26	-	2	11	8	-	47
Bombonas	7	-	-	4	5	1	17
Tampa	2	-	-	3	18	2	25
Vedante	8	-	-	-	-	-	8
Laminado para tampa	-	1	-	1	1	5	8
Saco	-	-	-	1	8	-	9
Reservatório	1	-	-	-	1	2	4
Copo	-	18	-	9	-	1	28
Total	44	19	2	29	41	11	146

PVC - POLICLORETO DE VINILA
 PS - POLIESTIRENO
 PET - POLIETIRENO TEREFALATO
 PP - POLIPROPILENO
 PE - POLIETILENO
 OUTROS - POLIETILENO E COPOLÍMERO DE ETILENO E ACETATO DE VINILA ALUMÍNIO E VERNIZ TERMOSELANTE
 POLIÉSTER
 POLICARBONATO

RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se relacionados na tabela 2. Note-se que algumas amostras foram rejeitadas por mais de um parâmetro analítico.

A tabela 3 correlaciona o número e a porcentagem de amostras aprovadas no período de estudo.

No caso da determinação da migração total de substâncias orgânicas, o maior valor obtido foi de 9,9 mg/l, sendo que a Resolução 13/75 permite até 0,3 mg/l. Da mesma forma, foi encontrado um valor de 22,8 mg/l, na determinação da migração total de substâncias minerais, quando o valor máximo tolerado nesta mesma Resolução é de 15 mg/l.

Os pigmentos e corantes utilizados neste tipo de embalagem foram também analisados e apresentaram teores de arsênio, chumbo e cádmio dentro dos limites previstos pela legislação atual.

DISCUSSÃO

Todas as embalagens analisadas, quando submetidas aos testes da Resolução 45/77 foram aprovadas, enquanto que 15% das amostras apresentaram-se em

TABELA 2

Comparação dos resultados dos diversos materiais de embalagem utilizados no acondicionamento de águas minerais quando submetidas à análise pelos métodos das Resoluções 45/77 e 13/75

Tipo de Material	Número de amostras analisadas	Resolução 45/77												Resolução 13/75											
														Características Organolépticas					Migração total de substâncias						
		Odor	Cor	Alteração amostra	Resíduo	Arsênio	Metais pesados	Total	Odor	Cor	Sabor	Minerais	Orgânicas	Permeab. ao fenol	Total										
A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C						
PVC	44	44	-	44	-	44	-	44	-	44	-	44	-	44	4	44	-	40	4	44	-	37	7		
PS	19	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	1	19	-	19	-	13	6	19	-	12	7
PET	2	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	2	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-
PP	29	29	-	29	-	29	-	29	-	29	-	29	-	29	29	29	-	29	-	26	3	29	-	26	3
PE	41	41	-	41	-	41	-	41	-	41	-	41	-	41	40	1	41	-	40	1	41	-	39	2	41
Outros	10	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	9	1	10	-	8	2	10	-	7	3	10

A - Aprovados

C - Condenados

TABELA 3

Porcentagem de aprovação de embalagens para águas minerais no período de 1983 a 1993.

	Ano										
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993
Número de amostras analisadas	14	6	3	13	32	19	2	12	11	17	17
Porcentagem de aprovação	86	67	100	77	88	84	100	100	100	65	82

desacordo nos testes realizados segundo a Resolução 13/75. O que por um lado se explica, uma vez que a Resolução 45/77 prevê um contato de 10 dias da embalagem com a água a uma temperatura de 40°C, enquanto que a Resolução 13/75 e o Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁶ estipulam um período de 30 dias de contato a 45°C, que mais se aproxima das condições reais de uso, além da diversidade de técnicas empregadas nas duas legislações. Também merece destaque a disparidade de resultados nos testes de odor efetuados pelas duas resoluções, como pode-se constatar na tabela 2

Das amostras em desacordo, 82% foram reprovadas pelo teste de migração total de substâncias orgânicas, teste este importante pois dá uma indicação da quantidade de substâncias passíveis de alterar as características organoléticas da água. A maioria das amostras condenadas apresentou valores significativos com relação ao limite máximo permitido. Quanto à migração de substâncias minerais, apenas uma amostra de selo de alumínio com verniz termosselante se apresentou acima do limite tolerado, provavelmente devido à imperfeições no verniz, que ocasionaram uma migração maior de alumínio.

A aprovação total dos corantes e pigmentos se deve à pouca diversidade de produtos utilizados na coloração deste tipo de embalagem, sendo que geralmente os mesmos não contêm sais de metais pesados em sua formulação.

De 1989 a 1991, a qualidade das embalagens de água mineral, com relação aos parâmetros verificados foi excelente, com 100% de aprovação neste período. Esperava-se que com estes resultados a qualidade se mantivesse constante nos anos posteriores, fato esse que não ocorreu com um decréscimo na porcentagem de aprovação (65%) em 1992 e um aumento em 1993 (82%). Modificações no processo de fabricação, alterações nos tipos de aditivos utilizados para diminuição de custos, embalagens alternativas, como também a entrada no mercado de novos fornecedores podem ser responsabilizados por esta queda na qualidade.

Os dados contidos na tabela 3 mostram a necessidade de se manter um controle periódico neste tipo de embalagem. Verifica-se também nesta tabela que

não existe um controle sistemático de embalagens para água mineral nem pela fiscalização nem pelos fabricantes, pois o número de amostras analisadas anualmente varia muito, sendo necessária uma programação através dos órgãos de fiscalização para sanar esta deficiência.

Dos tipos de materiais plásticos analisados, o que apresentou o maior índice de rejeição foi o poliestireno (63,16%), devido provavelmente à migração do monômero de estireno. Enfatiza-se que deve existir um controle de monômero residual em embalagens elaboradas com este tipo de polímero. O polietileno, o polipropileno, o policloreto de vinila e o polietileno tereftalato apresentaram boa porcentagem de aprovação (95,12; 89,66; 84,10 e 100, respectivamente).

CONCLUSÕES

O padrão de qualidade das embalagens analisadas não variou muito durante o período de estudo, apesar de um decréscimo nos dois últimos anos.

Este trabalho procurou demonstrar a necessidade de manter os testes adicionais previstos na Resolução 13/75, tanto no aspecto de Saúde Pública quanto de controle de qualidade industrial. Do ponto de vista de Saúde Pública, verificando a migração de componentes tóxicos, orgânicos ou minerais, e a permeabilidade a componentes nocivos à saúde. Do ponto de vista de controle de qualidade industrial, avaliando, além dos itens acima citados, as possíveis alterações organoléticas que, mesmo sem risco ao consumidor, comprometem a qualidade da água embalada.

Portanto, deve-se considerar, no âmbito do MERCOSUL, uma diferenciação entre embalagens de alimentos e de água mineral, para que não se perca em qualidade de controle quando da substituição da legislação atual pelos regulamentos técnicos do Grupo Mercado Comum.

Recomenda-se, também, efetuar uma revisão e atualização nos parâmetros avaliados, com ênfase na determinação de migrações específicas de monômeros e aditivos de interesse em Saúde Pública, bem como definir mecanismos para uma avaliação periódica deste tipo de embalagem.

RIALA6/770

MURATA, L.T.F.; NUNES, M.C.D.; ALCÂNTARA, M.R.S.; PASCUET, N.S. & MINAS, V.H.M. - Mineral water packaging: quality control and methodology evaluation. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 102-6, 1994.

ABSTRACT: 146 samples for mineral water packaging were analysed for the period 1983-1993, by according tests from two brazilian legislations: the Res. 45/77 that fix standards tests to value the quality of food packaging and the Res. 13/75 that fix specific tests for mineral water packaging. All samples tested by one of them (Res. 45/77) were approved and 15% of samples were in disagreement by the tests from the other one (Res. 13/75). The plastic material with more insatisfactory conditions were polystyrene. The purpose of this work is include the specific tests from 13/75 legislation in MERCOSUL laws.

DESCRIPTORS: Mineral water packaging, determinations. Sensory perceptions. Total migration of organics and mineral substances and permeability.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARGENTINA. Leis, decretos, etc. - Código Alimentario Actualizado. Boletín Oficial, 30 jun 71, p.45 - 58.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Determinação da permeabilidade a gases e vapores: método de ensaio*. São Paulo, ABNT, 1986 (Projeto Nº 23:05.08 - 004).
3. BÉLGICA. Leis, decretos, etc. - Arrêté royal du 25 août 1976, du Ministère de la Santé Publique et de la Laiterie. *Moniteur Belge*, Bruxelles, 24 sept. 1976. p. 12029 - 82. Completé l'arrêté royal du 12 sept. 1972 relatif à la fabrication, au commerce et à l'emploi des objets et substances alimentaires.
4. BÉLGICA, INSTITUT BELGE DE NORMALISATION. *Analyse des eaux: détermination de l'oxydabilité a chaud - méthode par le permanganate de potassium* Bruxelles, IBN, 1974. (NBNT 91 - 202).
5. BOLETIM DE INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA. Rio de Janeiro, Ministério das Relações Exteriores. Nº 12, jan/ mar. 1994.
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução 25/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 12 jan. 1977. Seção I, pt. 1, p. 1483 - 86. Estabelece padrões de identidade e qualidade para as águas minerais da fonte.
7. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução 13/75 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 30 jul. 1975. Seção I, pt. 1, p. 9518. Dispõe sobre o acondicionamento de águas minerais ou de mesa em recipientes elaborados com substâncias resinosas e/ou poliméricas.
8. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução 45/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1º fev. 1978. Seção I, pt. 1, p.1781 - 95. Aprova as listas de polímeros, resinas e respectivos aditivos e regulamenta seu emprego na elaboração ou revestimento de embalagens.
9. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - Directive du Conseil du 15 juillet 1980 - Relative au rapprochement des législations des États membres concernant l'exploitation et la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles. (30.8.80 Nº L 229/1 80/777/CEE).
10. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, São Paulo. *Água: determinação de oxigênio consumido: método de permanganato de potássio*, São Paulo, CETESB, 1993. 4p.
11. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, São Paulo. *Determinação de sólidos em água: métodos gravimétricos*, São Paulo, CETESB, 1991. 16 p.
12. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, São Paulo. *Invólucros e recipientes plásticos para águas minerais*. São Paulo, CETESB, sd. 170 p.
13. FRANÇA. ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. *Essais des eaux: dosage de l'oxygène cédé par le permanganate de potassium*. Paris, AFNOR, 1960 (NBNT 91-202).
14. FRANÇA. Leis, decretos, etc. Protocole d'expertise du conditionnement des eaux potables ou gazéifiées en matériau autre que le verre. *Journal Officiel de la République Française*, 25 août 1971, s 458.
15. GARCIA, E.E.C. Embalagem para água mineral. *Informativo CETEA*, Campinas: V.1, Nº 4, p.2-3, 1989.
16. 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. 458-463.
17. POPOFF, G. - Acondicionamento de águas em embalagem descartável. Laboratoire National de la Santé de la France - 17 de novembro de 1988. {Apresentado no Seminário Internacional "O PVC na Embalagem de Água Mineral", São Paulo SP, 1988}.
18. SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE ÁGUAS MINERAIS. SINDINAM. *Jornal Informativo*, v. 1, Nº 1, jul/ago., 1992.

Recebido para publicação: 20.04.94

AVALIAÇÃO DO VALOR CALÓRICO DE CHOCOLATES DIETÉTICOS*

Rejane Weissheimer de ABREU**
Irani Rodrigues de OLIVEIRA**
Odair ZENEBO**

RIALA6/771

ABREU, R. W.; OLIVEIRA, I.R. & ZENEBO, O. - Avaliação do valor calórico de chocolates dietéticos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 107-9, 1994.

RESUMO: Para avaliar o valor calórico de chocolates dietéticos disponíveis no comércio, foram analisados 15 produtos convencionais e 15 dietéticos, através da composição centesimal (protídios, lipídios e glicídios). Os métodos analíticos utilizados estão descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Os valores encontrados variaram de 506 a 549 kcal/100 g, para os chocolates convencionais, e de 503 a 615 kcal/100 g, para os dietéticos. Dos resultados obtidos, concluiu-se que o valor calórico de chocolates dietéticos é significativamente superior aos dos chocolates convencionais e o consumidor deve ser alertado para esse fato, pois estes alimentos não são adequados para as pessoas que estão sob regime de emagrecimento.

DESCRIPTORIOS: Valor calórico dos chocolates, determinação; chocolates dietéticos. determinação do valor calórico; composição centesimal.

INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos dietéticos, os chocolates são amplamente consumidos tanto por pessoas portadoras de diabetes, como por aquelas que estão em regime de emagrecimento. Muitas vezes a população consumidora não está consciente do alimento dietético que está ingerindo, pois pela definição da legislação em vigor, nem sempre significa tratar-se de alimento de baixa caloria¹.

Nos últimos anos, houve uma grande expansão no mercado de alimentos dietéticos, onde as indústrias nacionais lançaram diversos produtos para atender à demanda da população que necessita de dieta especial e que anteriormente só tinha acesso aos produtos importados. Diante deste universo de alimentos dietéticos, o consumidor, na maioria das vezes, não está suficientemente informado a respeito do produto que está adquirindo, talvez por não ler a rotulagem ou por não entender os dizeres nela conti-

dos. Na rotulagem dos alimentos dietéticos é obrigatório constar, entre outros dizeres, a finalidade do produto e a declaração do seu valor calórico¹. Entretanto, todos estes dados são irrelevantes se o consumidor não tiver em mente que as informações explicitadas no rótulo são dirigidas a ele.

Os chocolates dietéticos são especialmente elaborados e formulados, substituindo, adicionando ou suprimindo, parcial ou totalmente, um ou mais de seus componentes, de forma que sua composição atenda às necessidades dietéticas específicas de pessoas com exigências metabólicas, fisiológicas ou físicas particulares. Em comparação com os produtos convencionais, nos chocolates dietéticos há substituição do açúcar (sacarose) por edulcorantes permitidos no Brasil, tais como aspartame, sacarina, ciclamato, steveosídeo, sorbitol, manitol, acesulfame K^{3,4} e adição de maior proporção de manteiga de cacau e leite, e, conseqüentemente, aumento do teor de lipídios e protídios.

* Realizado na Seção de Doces e Amiláceos da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz
** Do Instituto Adolfo Lutz

Fundamentados na necessidade de esclarecer aos usuários de alimentos dietéticos, principalmente os que os utilizam em dieta de emagrecimento, e por desconhecerem, a nível nacional, a existência de pesquisa semelhante, os autores se propuseram a avaliar o valor calórico de chocolates dietéticos disponíveis em nosso comércio.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram analisados 15 chocolates convencionais e 15 dietéticos, de diferentes marcas de fabricação nacional, disponíveis no comércio da cidade de São Paulo.

Métodos

A determinação de protídios, lipídios e glicídios, foi efetuada segundo os métodos oficiais, constantes das "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"⁶.

O valor calórico de cada amostra analisada foi calculado utilizando-se os fatores de conversão tradicionais, ou seja: protídios (4kcal/g), lipídios (9kcal/g) e carboidratos (4kcal/g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de lipídios, protídios e glicídios e os valores calóricos calculados para os chocolates convencionais e dietéticos, estão expressos nas tabelas abaixo:

TABELA 1

Composição centesimal e valor calórico de chocolates convencionais

Amostra nº	Lipídio (%)	Protídios (%)	Carboidratos (%)	Valor calórico (Kcal/100g)
1	30,55	7,92	57,56	537
2	28,96	7,84	59,28	529
3	30,86	7,67	57,92	541
4	33,86	6,16	53,90	546
5	31,61	5,64	59,20	543
6	30,74	8,35	55,42	532
7	32,46	6,16	57,95	549
8	30,91	8,35	56,49	537
9	29,26	6,95	59,06	527
10	30,28	6,78	57,19	528
11	28,29	7,48	58,71	520
12	30,44	6,84	57,74	536
13	30,29	6,89	59,44	538
14	30,57	6,65	59,59	540
15	28,20	5,81	57,36	506

TABELA 2

Composição centesimal e valor calórico de chocolates dietéticos

Amostra nº	Lipídios (%)	Protídios (%)	Carboidratos (%)	Valor calórico (Kcal/100g)
1	43,73	19,17	19,56	548
2	43,73	9,09	14,06	486
3	37,00	5,82	17,14	424
4	47,10	22,05	7,48	542
5	48,62	10,80	14,56	539
6	52,65	12,25	17,50	593
7	53,37	9,94	10,90	564
8	30,92	17,63	34,60	487
9	35,19	10,28	20,91	442
10	47,10	22,05	7,48	542
11	52,61	12,16	18,74	597
12	55,11	12,51	17,30	615
13	45,12	9,76	14,48	503
14	55,77	10,60	13,51	562
15	43,73	9,09	14,06	486

GRÁFICO 1

Composição Centesimal - Média de Valores

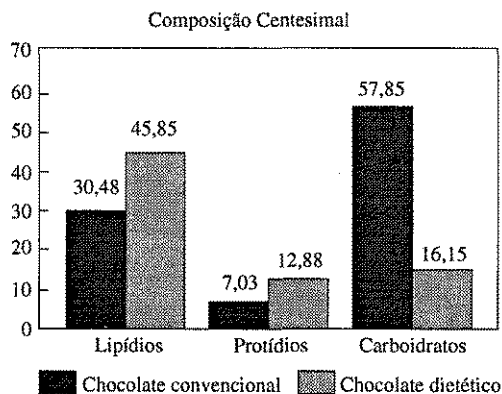
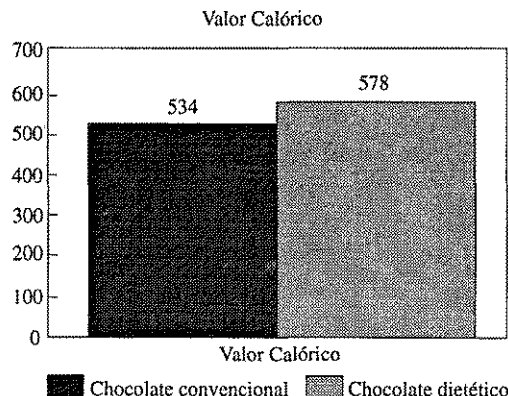


GRÁFICO 2

Valor Calórico - Média de Valores



Os resultados apresentados nos gráficos 1 e 2 referem-se à média de valores encontrada nos chocolates convencionais e nos chocolates dietéticos. Os valores calóricos variaram de 506 a 549 kcal/100 g para os chocolates convencionais e de 503 a 615 kcal/100 g para os chocolates dietéticos.

Nos chocolates dietéticos deve-se ainda considerar um acréscimo de 50 kcal/100 g provenientes de sorbitol e manitol adicionados à amostra, que fornece 2,4 Kcal/g⁶. O sorbitol e manitol não foram quantificados e computados na composição centesimal dos produtos analisados neste trabalho.

A explicação para os valores encontrados fundamenta-se no fato de que nos chocolates dietéticos há adição de maior quantidade de manteiga de cacau e

leite, conseqüentemente um aumento do valor de lipídios e protídios.

CONCLUSÕES

De maneira geral, os chocolates dietéticos comercializados têm valor calórico superior aos chocolates convencionais.

Os consumidores devem ser conscientizados da importância da rotulagem dos produtos e, no caso de dúvidas sobre as informações nela contidas, devem consultar os Órgãos de Proteção ao Consumidor e os Serviços de Vigilância Sanitária.

Chocolates dietéticos são indicados para diabéticos, pela substituição do açúcar (sacarose) e contra indicados para regimes de emagrecimento, pelo seu alto valor calórico.

RIALA6/771

ABREU, R.W.; OLIVEIRA, I.R. & ZENEON, O - Caloric value of dietetic chocolate evaluation. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 107-9, 1994.

ABSTRACTS: 15 samples of conventional chocolate and 15 samples of dietetic chocolate sold in São Paulo city, Brazil, were analysed for protein, lipid and glydic contents, to determine their caloric values. The authors concluded that the caloric value of dietetic chocolate were above the conventional chocolate grade. As a conclusion, the consumer must be aware for these foods are not adequate to fat regime persons.

DISCRIPTORS: Caloric value of chocolate, evaluation; dietetic chocolate.

REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil - Leis, decretos, etc. Portaria n° 23 de 04.04.1988, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, *Diário Oficial*, Brasília, 07.04.88. Aprova normas sobre alimentos dietéticos.
2. Brasil - Leis, decretos, etc. Portaria n° 24 de 04.04.1988, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - SNVS, do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 19.10.1989. Aprova normas sobre alimentos dietéticos.
3. Brasil - Leis, decretos, etc. Portaria n° 04 de 24.11.1988, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, *Diário Oficial*, Brasília, 19.12.1988. Seção I pt I p. 24716. Aprova a revisão das tabelas I,III,IV e V referentes à Aditivos Intencionais, bem como anexos I,II,III,IV e VII, todos do Decreto n° 55871 de 26.03.1965.
4. Brasil - Leis, decretos, etc. Portaria n° 32 de 17.10.1989 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - DINAL, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - SNVS do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 19.10.1989. Aprova normas sobre alimentos dietéticos.
5. São Paulo - Instituto Adolfo Lutz - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo. Imprensa Oficial do Estado, 1985. p.42, 44 e 46.
6. Conseil des Communautés Europeenes. Directive du Conseil du 24 septembre 1990, relative à l'étiquetage nutritionnel des denrées alimentaires. *Journal Officiel des Communautés Européenes*, n° L 276, 6 oct. 1990, p. 40-44(90/496/CEE).

Recebido para publicação 20.04.94.

AS SERRALHAS DO BRASIL: *EMILIA SONCHIFOLIA* L., *SONCHUS ASPER* (L.) HILL E
TARAXACUM OFFICINALE WEBER - EXAME MICROSCÓPIO COMPARATIVO.

Luzia Ilza Ferreira JORGE **
Vicente de Oliveira FERRO **
Iraci de OLIVEIRA ***

RIALA6/772

RIALA / JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & OLIVEIRA, I. - As serralhas do Brasil: *Emilia sonchifolia* L., *Sonchus asper* (L.) Hill e *Taraxacum officinale* Weber - exame microscópico comparativo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 110-4, 1994.

RESUMO: Foram morfo-histologicamente descritas as folhas de três espécies de compostas de interesse medicinal e/ou alimentar: *Emilia sonchifolia* L., *Sonchus asper* (L.) Hill e *Taraxacum officinale* Weber. O estudo foi desenvolvido de forma comparativa, visando a distinção das espécies mesmo quando empregadas em mistura ou em substituições entre si (fraude). Dimensões relativas das células epidérmicas, distribuição de estômatos, ocorrência de estômatos geminados e tubos de látex, foram algumas das características histológicas destacadas como de importância diagnóstica para a identificação das espécies quando comercializadas (tecnologicamente processadas, fragmentadas, trituradas, etc).

DESCRITORES: *Emilia sonchifolia* L., *Sonchus asper* (L.) Hill, *Taraxacum officinale* Weber, serralha, serralhinha, dente-de-leão, vitiligo, anti-vitiligo.

INTRODUÇÃO

Diversos vegetais cosmopolitas da família *Asteraceae* (ou *Compositae*) popularmente designados serralha, são comestíveis e medicinais, de sabor amargo, tônicos para o estômago, adstringentes, anti-diarreicos e anti-térmicos: *Sonchus oleraceus* L.; *Sonchus asper* (L.) Hill; *Sonchus arvensis* L.; *Silybum marianum* L.; *Taraxacum sp*; *Emilia sonchifolia* D.C., etc^{1,2,7,13,17}.

Às espécies do gênero *Sonchus* é atribuída atividade anti-vitiligo, moléstia dermatológica de péssimos efeitos psicológicos, que não tem cura no âmbito da química farmacêutica até os dias de hoje⁷.

O presente trabalho tem por objetivo fornecer dados para exame microscópico de três espécies de serralhas, com vistas ao seu reconhecimento quando comercializadas (formas trituradas, pulverizadas, submetidas à ação do calor, etc). Indiretamente também fornecemos subsídios à identificação do vege-

tal para posteriores estudos farmacológicos e toxicológicos. São aqui estudadas as seguintes espécies: *Emilia sonchifolia* L. (serralhinha), *Sonchus asper* (L.) Hill (serralha de espinho) e *Taraxacum officinale* Weber (dente-de-leão).

Emilia sonchifolia L. é espécie rica em flavonóides, ácidos fenólicos, esteróides e terpenóides^{12,15}.

Taraxacum officinale Weber apresenta teores apreciáveis de triterpenóides, vitamina A, esteróides, aminoácidos, açúcares e minerais^{3,6,8,10}. A espécie é pobre em vitamina C e contém menos ácido oxálico do que o espinafre^{9,14}. O taraxasterol ou taraxasterina é um álcool triterpênico idêntico à antesterina de *Anthemis nobilis* e ao alfa-lactucérol encontrado no látex de *Lactuca virosa*, *Cichorium intybus* e *Sonchus asper* L.^{3,16}. Há estudos acerca da anatomia foliar e radicular de *Taraxacum officinale* Weber^{2,4,8}, porém as informações ou são incompletas e sem figuras, ou não objetivam a finalidade diagnóstica.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do IAL, Capital, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz

*** Da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP).

MATERIAL E MÉTODO

As espécies foram coletadas nos jardins do Instituto Adolfo Lutz, nesta Capital, tendo sido identificadas pelos autores⁷.

Foram efetuados cortes anatómicos a mão livre, obtidos com auxílio de lâmina de barbear e medula de sabugueiro como suporte. Os fragmentos assim obtidos foram submetidos a descoloração em solução de hipoclorito de sódio 10% e coloração com solução de lugol e/ou solução de floroglucina clorídrica 20%. Foram empregados microscópio óptico, câmara clara e régua micrométrica.

RESULTADOS

Exame morfológico

A folha de *Sonchus asper* (L.) Hill é pinatipartida, auriculada e amplexicante como a de *Sonchus oleraceus* L., descrita em trabalho anterior⁷. Uma vez destacadas do caule, somente podem ser diferenciadas pelos bordos, que são mais fortemente dentea-

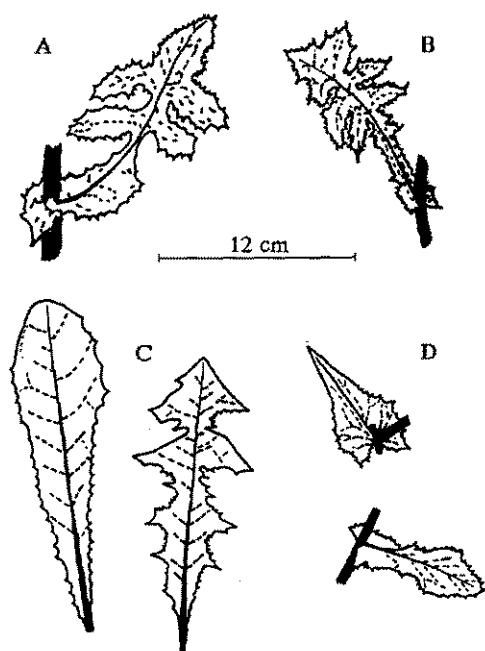
dos na primeira espécie (Figura 1-A e Figura 1-B). O caule de *Sonchus asper* (L.) Hill não apresenta ramificações ao passo que o caule de *Sonchus oleraceus* L. é ramificado.

Taraxacum officinale Weber é erva acaule, com folhas fortemente recortadas ou em forma de espátula (Figura 1-C). Suas folhas são sésseis, atenuadas em pecíolo, diferentes das folhas amplexicantes de *Sonchus sp* e de *Emilia sonchifolia* L. A nervura central da folha de *Taraxacum officinale* Weber é bem larga e proeminente no terço médio inferior, estreitando-se em direção ao ápice (Figura 1-C).

As folhas de *Emilia sonchifolia* L. são menores relativamente às de *Sonchus sp* e às de *Taraxacum officinale* Weber. São cordiformes ou elípticas, com ápice acuminado ou obtuso, margem denteada e base amplexicante. Como em *Sonchus sp*, a disposição das folhas é alternada.

Exame microscópico

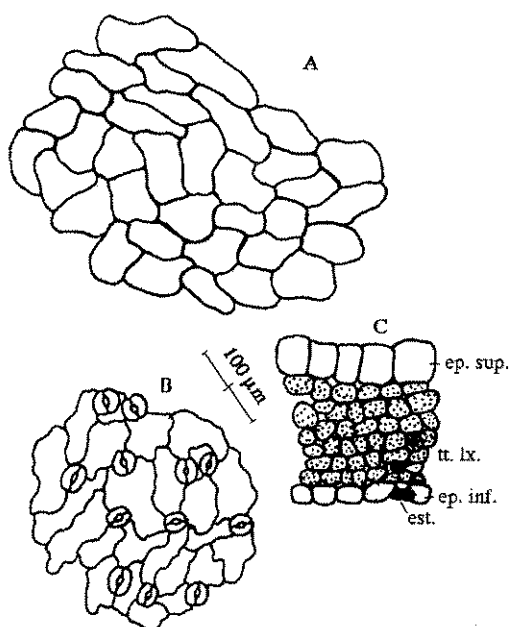
Sonchus asper (L.) Hill (serralha, serralha-espinhenta)¹³.



A - *Sonchus oleraceus* L. (serralha)
B - *Sonchus asper* (L.) Hill (serralha de espinho)
C - *Taraxacum officinale* Weber (dente-de-leão)
D - *Emilia sonchifolia* L. (serralhinha)

FIGURA 1

Serralhas brasileiras - folhas



A - Epiderme superior
B - Epiderme inferior
C - Limbo foliar (corte transversal) - ep. sup. = epiderme superior; t. lx. = tubo de látex; ep. inf. = epiderme inferior; est. = estômato.

FIGURA 2

Sonchus asper (L.) Hill (serralha espinhenta)

Observadas em secção paradérmica, as epidermes foliares de *Sonchus asper* (L.) Hill são constituídas de células de contorno sinuoso, com estômatos anomocíticos restritos à epiderme inferior (Figura 2-A e Figura 2-B). Observadas em corte transversal, as células da epiderme superior são radialmente alongadas e bem maiores do que as células da epiderme inferior, que são periclinalmente alongadas (Figura 2-C). O mesofilo é homogêneo lacunoso, apresentando tubos de látex articulados que percorrem a estrutura na mesma direção dos vasos. Os feixes vasculares são colaterais abertos e não há inclusões celulares.

A nervura central é plano-convexa, alargada na base e estreitando-se em direção ao ápice, onde se apresenta bi-convexa. Há um feixe vascular central e dois pequenos feixes que o flanqueiam. Há colênquima discreto, constituído de duas camadas abaixo das epidermes.

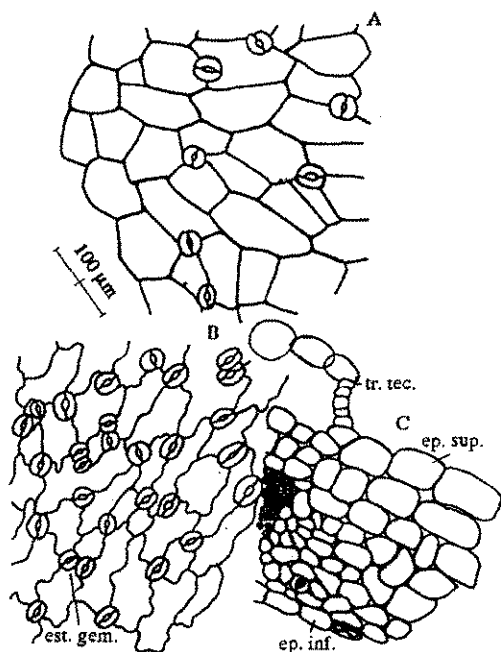
Taraxacum officinale Weber (serralha, dente-de-leão, dandelion).

Ambas as epidermes foliares de *Taraxacum officinale* Weber são estomatíferas, diferenciando-se pela porcentagem relativa desses estômatos e pelo

contorno das paredes celulares: contorno sinuoso na epiderme inferior e contorno poliédrico na epiderme superior (Figura 3-A e Figura 3-B).

Os estômatos são anomocíticos, porém há a ocorrência singular de estômatos geminados (dois ou três geminados) na epiderme inferior (Figura 3-B). Observadas em secção transversal, as células da epiderme superior são ligeiramente maiores do que as da epiderme inferior, sempre alongadas no sentido periclinal, em ambos os casos (Figura 3-C). Tricomas tectores pluricelulares são muito raros, mas podem ser ocasionalmente observados em cortes grossos (Figura 3-C). Há tubos de látex relacionados aos feixes vasculares, que são do tipo colateral aberto.

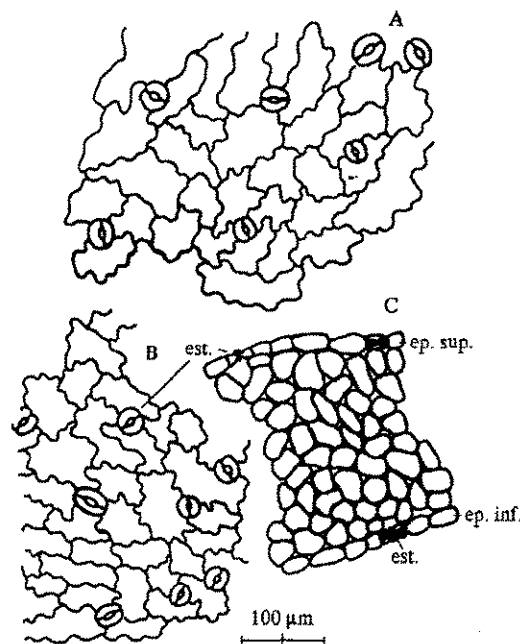
A nervura central é nítida, sendo proeminente na face inferior e ligeiramente saliente na face superior. Ela é bem larga nas porções inferiores, estreitando-se em direção ao ápice. Ao nível de nervura central, o feixe vascular principal (flanqueado por dois ou três feixes menores) apresenta feixe colateral. Em torno dos feixes vasculares ocorrem fibras peri-vasculares. O colênquima é abundante no lado inferior (três a cinco camadas) e discreto no lado superior (duas camadas).



A - Epiderme superior
B - Epiderme inferior - est. gem. = estômatos geminados
C - Limbo foliar (corte transversal) - tr. tec. = tricoma tector; ep. sup. = epiderme superior; ep. inf. = epiderme inferior.

FIGURA 3

Taraxacum officinale Weber (dente-de-leão)



A - Epiderme superior
B - Epiderme inferior
C - Limbo foliar (corte transversal) - ep. sup. = epiderme superior; ep. inf. = epiderme inferior; est. = estômato.

FIGURA 4

Emilia sonchifolia L. (serralhinha)

Emilia sonchifolia L. (serralha, serralhinha)¹³.

As epidermes foliares de *Emilia sonchifolia* L. são praticamente indistintas, tanto se observadas frontal como transversalmente seccionadas (Figuras 4-A, 4-B e 4-C). Observadas de face as células epidérmicas têm contorno sinuoso e são guarnecidas de estômatos anomocíticos (Figuras 4-A e 4-B). O corte transversal do limbo foliar revela mesofilo do tipo homogêneo lacunoso (Figura 4-C) e células epidérmicas alongadas no sentido periclinal.

A nervura central é plano-convexa, apresentando três feixes vasculares do tipo colateral ou bicolateral. A parte convexa (inferior) tem colênquima abaixo da epiderme. Tubos de látex ocorrem predominantemente em torno dos feixes vasculares, geralmente próximos ao floema.

DISCUSSÃO

Neste trabalho confirmamos a ocorrência de tubos laticíferos e de estômatos ranunculáceos, prevista por METCALFE & CHALK¹¹ como sendo universal dentro da família. Ressalvamos porém o registro de estômatos dois ou três geminados que fizemos para a espécie *Taraxacum officinale* Weber. É também original a estrutura homogênea que apresenta o mesofilo das espécies estudadas neste trabalho, uma vez que a família *Compositae* geralmente tem mesofilo foliar com simetria dorsiventral¹¹. *Sonchus oleraceus* L.⁷, espécie estudada em trabalho anterior pelos mesmos autores² apresenta mesofilo ligeiramente dorsiventral. *Sonchus oleraceus* L. apresenta pouca diferença entre as dimensões das células da epiderme superior e as da epiderme inferior. Em

Sonchus asper (L.) Hill, espécie estudada neste trabalho, essas dimensões são bem diferentes entre si, relativamente falando, principalmente se as células são observadas em corte transversal.

JORGE & FERRO⁷ apresentam desenho da secção transversal da nervura foliar central de *Sonchus oleraceus* L.: "contorno plano-convexo, presença de três feixes vasculares do tipo colateral, envoltos por tubos de látex, e colênquima discreto localizado sob a epiderme inferior". As espécies descritas neste trabalho apresentam idêntico tipo de estrutura para a nervura central.

Diversos autores observaram a ocorrência de flavonóides entre as espécies aqui estudadas, não havendo diferenças quali ou quantitativas entre as mesmas quanto a esta característica^{4,5,7,12,15,16}.

CONCLUSÕES

- *Sonchus asper* (L.) Hill: Há diferença expressiva nas dimensões relativas das células da epiderme superior comparadas às da epiderme inferior. Os estômatos são restritos à epiderme inferior.
- *Taraxacum officinale* Weber: Há presença de estômatos geminados. Ambas as epidermes foliares são estomáticas.
- *Emilia sonchifolia* L.: As epidermes superior e inferior são praticamente indistintas, tanto se observadas frontal como radialmente.

As três espécies estudadas apresentam mesofilo foliar do tipo homogêneo lacunoso e tubos de látex. É rara a ocorrência de cristais ou de tricomas.

RIALA6/670

RIALA / JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & OLIVEIRA, I. - The serralhas of Brasil: *Emilia sonchifolia* L., *Sonchus asper* (L.) Hill e *Taraxacum officinale* Weber - compared microscopic examination. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 110-4, 1994.

ABSTRACT: Leaves of three species of *Compositae* were morpho-histological studied: *Emilia sonchifolia* L., *Sonchus asper* (L.) Hill and *Taraxacum officinale* Weber. The study was carried out by comparison intending to differentiate the species even when they were employed in mixture or in frauds by substitution between themselves. Relative dimensions of epidermal cells, occurrence of double or triple stomas and latex ducts were some of the histological characteristics detached as important to the diagnosis of the species when they were treated (industrialized, strongly triturated, etc).

DESCRIPTORS: *Emilia sonchifolia* L., *Sonchus asper* (L.) Hill, *Taraxacum officinale* Weber, serralha, serralhinha, tooth of lion, vitiligo, anti-vitiligo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARANHA, C.; BACCHI, O. & LEITÃO FILHO, H. - *Plantas invasoras de culturas*. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1982. v.2 p. 412-3.
2. BERGER, F. - *Handbuch der Drogenkunde*. Viena, Verlag Wilhelm Maudrich, 1954. p. 499-500.
3. BESORA, C. - *Taraxacum officinale*. *Circ. Farm.*, 32 (245):641-3, 1974.
4. *BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA*, 5 ed. Londres, British Herbal Medici & Association, 1983. p.206-7.
5. FABER, K. - Der Löwenzahn - *Taraxacum officinale* Weber. *Die Pharmazie*, 13:423-36, 1958.
6. FRANKE, W. & LAWRENZ, M. - On the contents of protein and its composition of aminoacids in leaves of some medicinal spice plants, edible as greens. *Herba Hung.*, 19(1):71-82, 1980.
7. JORGE, L.I.F. & FERRO, V.O. - Identificação de *Sonchus oleraceus* L. (serralha). Principais características estruturais e químicas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2,3,4: 67-77, 1987/1989.
8. KIRCHNER, A. - The common dandelion (*T. officinale*). *Pflanzenbau*, 99:488-518, 1955.
9. KLEINER, T.S. & LAUBER, H. - The antiscorbutic value of dandelion. *Science*, 82:552, 1985.
10. KRAMER, M.M. - Vitamin content of foods in relation to human nutrition. *Rept.*, 32:118-9, 1934. Apud *Chem. Abstr.*, Columbus, 30:22349, 1935.
11. METCALFE, C.R. & CHALK, L. - *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 1950. v.2. p. 782-95.
12. NAIR, A.G.; GUNASEGARAN, R. & JOSHI, B.S. - Chemical investigation of certain South Indian plants. *Indian J. Chem.*, 21B (10):979-80, 1982.
13. PIO CORREA, M. - *Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1931, 1974 e 1978. v.2,5 e 6. p.109-15, 480 e 525-6.
14. RYDER, A.E. - The oxalic content of vegetables used as greens. *J.Home Econ.*, 22:309-14, 1930.
15. SRINIVASAN, K.K. & SUBRAMANIAN, S.S. - Chemical investigation of *Emilia sonchifolia*. *Fitoterapia*, 51:241-3, 1980.
16. STANISLAU, G.; LUCZKIEWICZ, I. & RASZEJA, W. - Diagnosis of herbal medicinal drugs by thin-layer chromatographic method. *Farm.Pol.*, 29 (4):313-8, 1973.
17. ZURLO, C. & BRANDÃO, M. - As Ervas comestíveis. Globo, Rio de Janeiro, 1989, p.53-7, 112-8.

Recebido para publicação: 20.04.94

A IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO E DO ESTUDO FAMILIAR NA ANOMALIA DE PELGER-HUËT *

Cecília KITAMURA**
Fernanda Alves CANGERANA**
Ryuko Miyamaru YOKOMIZO**
Elena Yoko GUSHIKEN**
Luiz Italo NIERO**
Marcos Antonio Gonçalves MUNHOZ**

RIALA6/773

KITAMURA, C.; CANGERANA, F.A.; YOKOMIZO, R.M.; GUSHIKEN, E.Y.; NIERO, L.I. & MUNHOZ, M.A.G. - A importância do diagnóstico e do estudo familiar na anomalia de Pelger-Huët. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 54(2): 115-20, 1994.

RESUMO: A anomalia de Pelger-Huët é uma alteração leucocitária autossômica dominante, caracterizada pela segmentação incompleta do núcleo dos neutrófilos e eosinófilos. A forma heterozigoto em geral é assintomática, com prevalência que varia de 1:1.000 a 1:10.000 pessoas, podendo acometer caucasóides, negróides e orientais. A forma homozigoto é extremamente rara, algumas vezes letal. Os autores estudaram o sangue periférico de uma família de dez pessoas, sete portadoras desta anomalia, nas quais os neutrófilos e eosinófilos apresentaram núcleos com aspecto em "casca de amendoim" e "óculos" (pince-nez), com cromatina mais densa. No heredograma é ilustrada a distribuição da anomalia nos indivíduos portadores. O reconhecimento desta anomalia leucocitária nos hemogramas é importante, pois evita interpretações clínicas errôneas, como o "desvio à esquerda" por causa infecciosa.

DESCRITORES: Leucócitos. Anomalia de Pelger-Huët.

INTRODUÇÃO

A anomalia leucocitária de Pelger-Huët consiste em uma deficiência no desenvolvimento do núcleo dos granulócitos, em especial nos neutrófilos e eosinófilos, que apresentam dificuldade na sua segmentação. Foi descrita inicialmente por Pelger em 1928, que julgava tratar-se de uma manifestação da tuberculose e posteriormente por Huët, em 1931, que mostrou a característica genética com sua herança autossômica dominante. A forma heterozigoto é mais encontrada e em geral é assintomática. É descrita em caucasóides, negróides e orientais numa prevalência que varia de 1:1.000 a 1:10.000 pessoas, dependendo da região estudada^{3,6,11,12,14,16,17,22,24}. No sangue periférico desses indivíduos encontramos um

aumento significativo do número de neutrófilos bastonetes, cujos núcleos apresentam em sua maioria, aspecto de "casca de amendoim", com cromatina mais densa. Os neutrófilos que conseguem segmentar-se, em geral não apresentam mais do que dois lobos, unidos por um denso filamento cromatínico, dando ao núcleo um aspecto de "óculos" (pince-nez)^{1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,21,22,24,25}.

Uma variante da forma heterozigoto (Stodtmeister) é caracterizada pela presença de núcleos redondos, com pequena chanfradura, lembrando metamielócitos^{3,15,17,19,22,24}.

A forma homozigoto é rara (1:1.000.000 pessoas)^{1,3,24}, algumas vezes letal, podendo apresentar

* Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central.

** Do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central.

distúrbios esqueléticos; afetando neutrófilos, eosinófilos, basófilos e megacariócitos^{1,3,6,10,11,18,24}.

Os neutrófilos apresentam núcleos, a maioria redondos, com grande densidade cromatínica, número de grânulos secundários diminuídos e mais grosseiros^{10,14,16,19,22,24}.

Nas síndromes mielodisplásicas, leucemia mielóide aguda, doenças mieloproliferativas como a leucemia mielóide crônica e a metaplasia mielóide, anemia de Fanconi, câncer metastático do osso, infecções crônicas do intestino, mononucleose infecciosa, malária e no uso de medicamentos como colchicina, sulfonamida e agentes terapêuticos mielotóxicos, podemos encontrar bastonetes com aspecto pelgeróide (pseudo-Pelger-Huët) fazendo parte do quadro hematológico. Entretanto, nessas situações, essas alterações nucleares frequentemente são transitórias^{2,3,4,5,9,11,12,14,15,16,20,21,24,25}.

O objetivo deste trabalho é apresentar o estudo morfológico dos granulócitos e o heredograma obtidos de uma família portadora desta anomalia, além de salientar a importância do diagnóstico diferencial desta alteração leucocitária, com o "desvio à esquerda" por causa infecciosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho originou-se de um caso isolado de uma senhora de 66 anos, funcionária do Instituto Adolfo Lutz, com quadro infeccioso aparente, cujo hemograma indicava discreta leucopenia e bastonetose, sugestiva de anomalia de Pelger-Huët. Realizamos então um estudo familiar, onde analisamos amostras de sangue de mais sete pessoas consanguíneas: duas irmãs, uma filha, dois netos, uma bisneta e um sobrinho. Estudamos também um cunhado e a esposa de um neto, visando obter maior número de informações hematológicas para o heredograma. Não foi possível obtermos amostras de sangue do marido da paciente, já falecido e de dois genros da mesma. Todas as amostras de sangue foram coletadas em tubos de vidro, sistema a vácuo, 5 ml, com EDTA e as contagens globais dos leucócitos foram obtidas em analisador hematológico TOA Sysmex CC-110.

Os esfregaços de sangue foram corados pelo corante de Leishman e as contagens diferenciais dos leucócitos realizadas em microscópio óptico comum, com objetiva de imersão.

Construímos um heredograma para melhor visualizar a distribuição da anomalia nos membros da família.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens globais e dos diferenciais dos leucócitos são apresentados na tabela 1.

TABELA 1

Contagens globais de leucócitos (/mm³) e diferenciais de leucócitos(%)

n	idade	sexo	leuc/mm ³	Diferencial de leucócitos (%)					
				Bast	segm	eos	basof	linf	mon
1	66	F	4.500	30	22	01	-	43	04
2	76	F	6.700	01	41	01	-	48	09
3	59	F	6.000	34	08	03	-	53	02
4	52	M	4.000	01	33	06	-	49	11
5	44	F	7.400	33	27	06	01	35	08
6	22	M	4.600	17	14	34	01	30	04
7	24	M	8.500	13	29	16	01	33	08
8	21	F	8.000	02	54	06	01	34	03
9	23	F	9.500	38	29	06	-	23	04
10	1 a 10m	F	6.800	24	23	06	01	40	06

n 1 = paciente; n 2 = irmã; n 3 = irmã; n 4 = cunhado; n 5 = filha; n 6 = sobrinho; n 7 = neto; n 8 = esposa do neto; n 9 = neta e n 10 = bisneta.

Consideramos a soma total de bastonetes e segmentados de cada portador como 100%. Calculamos as variações de cada tipo de neutrófilo e encontramos: Neutrófilos bastonetes: 31 a 81% e Neutrófilos segmentados: 19 a 69%.

Nos portadores heterozigotos, 35% dos neutrófilos do sangue periférico são bastonetes, 70 a 90% são segmentados com dois lobos, menos de 10% possuem três lobos e nenhum apresenta quatro ou mais lobos^{15,21}.

Apresentamos na página seguinte o heredograma da família estudada.

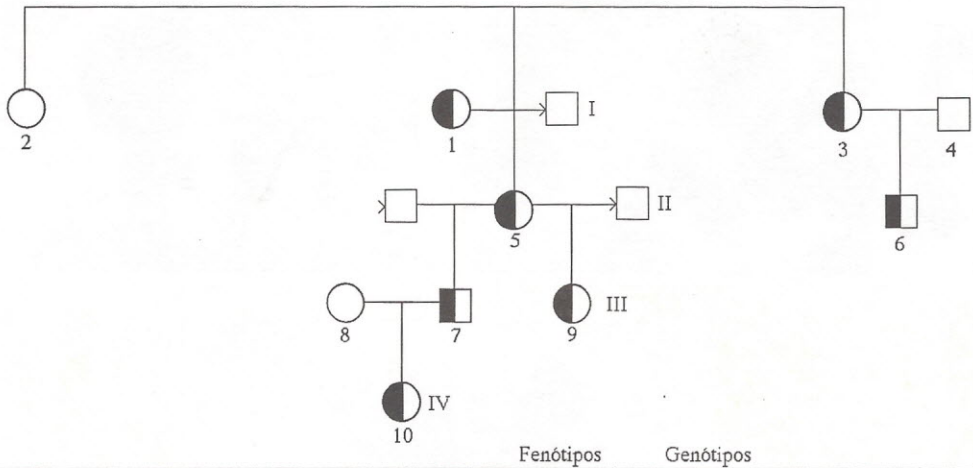
A irmã (n 2) não apresentou qualquer sinal da anomalia, apesar de ser consanguínea. Na herança mendeliana dominante, com um dos genitores heterozigoto e o outro normal, a probabilidade dos descendentes de não serem portadores é 50%; com dois genitores heterozigotos, essa probabilidade cai para 25%²³. O cunhado (n 4) e a esposa do neto (n 8) da paciente (n 1) não apresentaram sinais da anomalia, pois não eram parentes consanguíneos.

A herança autossômica dominante pode ser vista no heredograma nas quatro gerações estudadas, mostrando que cada pessoa afetada possui um genitor também afetado, aparecendo a anomalia em todas as gerações.

A anomalia leucocitária de Pelger-Huët possui a característica mendeliana autossômica dominante, com quase 100% de penetrância^{3,10}.

HEREDOGRAMA

ANOMALIA DE PELGER-HUËT HERANÇA AUTOSSÔMICA

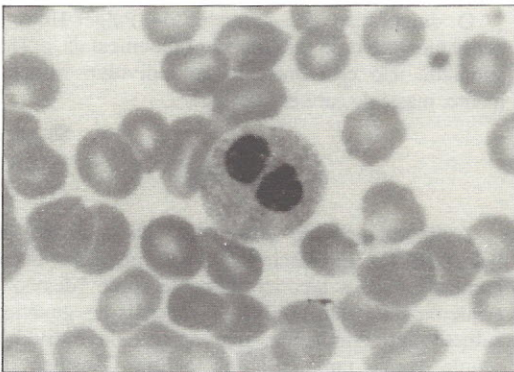


Fenótipos

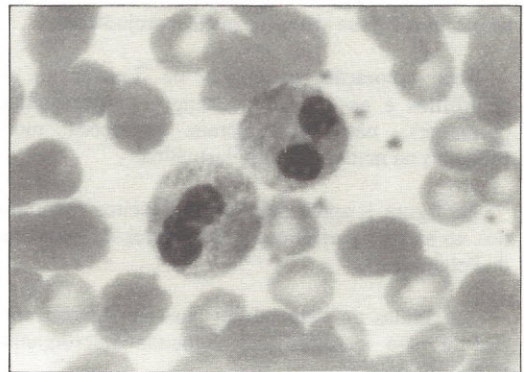
- | | | | | | |
|--|---------------------|--|----------------------|--|---------------------------------|
| | Mulher afetada PP | | Homem portador Pp | | Homem normal |
| | Mulher portadora Pp | | Homem não examinado | | Mulher normal |
| | Homem afetado PP | | Mulher não examinada | | Sexo desconhecido não examinado |

Em nosso estudo, dos oito membros consanguíneos da família, sete (87,5%) apresentaram a anomalia leucocitária de Pelger-Huët de forma heterozigoto (tabela 1 e heredograma), não sendo possível observarmos a proporção de 1 portador: 1 normal²³, devido a amostra estudada ser relativamente pequena.

Os esfregaços sanguíneos desses indivíduos apresentaram bastonetose, com núcleos em “casca de amendoim” e segmentados com dois lobos unidos por denso filamento cromatínico em forma de “óculos” (pince-nez) e cromatina mais densa. Não observamos neutrófilos com núcleos redondos (Stodtmeister). Raros neutrófilos apresentaram três lobos. Os eosinófilos



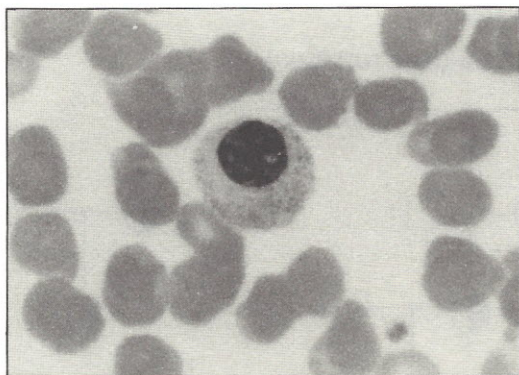
A: neutrófilo segmentado, núcleo com aspecto de “óculos” (pince-nez).



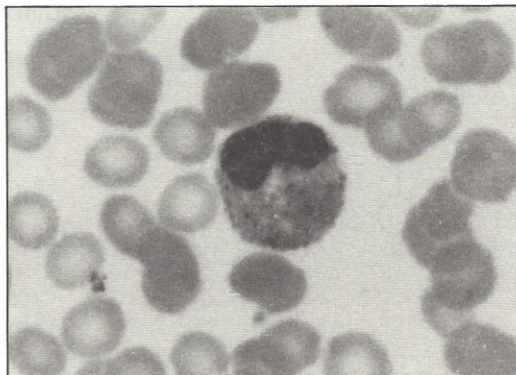
B: neutrófilos, núcleos com aspecto de “óculos” (pince-nez) e “casca de amendoim”.

FIGURA 1

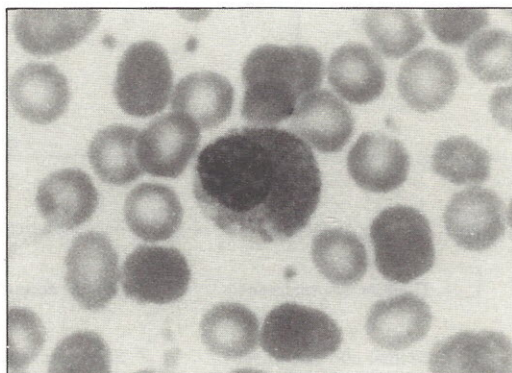
Fotomicrografias de sangue periférico apresentando células da anomalia de Pelger-Huët.



C: neutrófilo, núcleo redondo.



D: eosinófilo, núcleo com aspecto de "casca de amendoim".



E: eosinófilo, núcleo redondo, com chanfradura, lembrando metamielócito (Stodtmeister).

FIGURA 1 - Continuação

Fotomicrografias de sangue periférico apresentando células da anomalia de Pelger-Huët.

apresentaram as mesmas características nucleares que os neutrófilos, com predomínio da forma bilobulada, melhor observada nos portadores 6 e 7, que apresentaram eosinofilia mais pronunciada. Os basófilos, por estarem presentes em pequeno número e possuírem grande quantidade de grânulos metacromáticos grosseiros, tiveram sua avaliação nuclear prejudicada.

Pela coloração panóptica de Leishman, os neutrófilos e eosinófilos do sangue periférico dos portadores, não apresentaram alterações morfológicas na maturação citoplasmática.

Na figura 1, apresentamos granulócitos encontrados no sangue periférico de portadores da anomalia de Pelger-Huët.

As células de Pelger-Huët possuem função normal e são capazes de fagocitar microrganismos^{3,10,11,12,17,18,22}.

A anomalia em sua forma heterozigota em geral não tem sintomatologia clínica, sendo considerada benigna^{3,7,9,10,11,16,17,19}. Entretanto, as alterações morfológicas dos neutrófilos e eosinófilos presentes nos

esfregaços sanguíneos desses indivíduos, podem passar despercebidas por laboratorista menos experiente, considerando esta situação como "desvio à esquerda" devido à bastonetose presente, podendo ocasionar falsas interpretações clínicas.

O diagnóstico da anomalia de Pelger-Huët e consequente estudo familiar são fundamentais, pois a anomalia não está presente no indivíduo isoladamente, mas é de caráter familiar.

CONCLUSÕES

A importância do diagnóstico da anomalia de Pelger-Huët é imprescindível, pois pode ser interpretada clínica e laboratorialmente como "desvio à esquerda". É transmitida por mecanismo genético autossômico dominante, não apenas do indivíduo estudado, mas também à sua família. O estudo familiar se torna necessário para diagnosticar e alertar aos portadores de que estes possuem uma anomalia leucocitária benigna, mas que eventualmente pode ser interpretada erroneamente como reação a um processo agudo.

RIALA6/773

KITAMURA, C.; CANGERANA, F.A.; YOKOMIZO, R.M.; GUSHIKEN, E.Y. NIERO, L.I. & MUNHOZ, M.A.G. - The importance of the diagnostic and the family study of the Pelger-Huët anomaly. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 54(2): 115-20, 1994.

ABSTRACT: The Pelger-Huët anomaly is a dominant autosomic leukocytary abnormality, characterized by the incomplete segmentation of nucleus of the neutrophils and eosinophils. The heterozygous form is in general assymptomatic, with prevalence ranges from 1:1000 to 1:10.000, occurring in caucasians, negroes and orientals. The homozygous form is extremely rare, sometimes lethal. The authors are studying the peripheral blood from ten persons of the same family, which seven carried out this anomaly of neutrophils and eosinophils with the rod-like or spectacles-like (pince-nez) nuclei with more condensed chromatin. In the pedigree is illustrated the distribution of the anomaly. The identification of this leukocytary anomaly in the blood films is important to avoid erroneous clinical interpretations, as the left shift, on account of infection cause.

DESCRIPTORS: Leukocytes. Pelger-Huët anomaly.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEGEMANN, N.H. & CAMPAGNE, A.V.L. - Homozygous form of Pelger-Huët's nuclear anomaly in man. *Acta Haematol.* 7: 295-303, 1952.
2. BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G. GALTON, D.A.G.; GRALNICKH, R. & SULTAN, C. - Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br.J.Haematol.* 51: 189-199, 1982.
3. BRUNNING, R.D. - Morphologic alterations in nucleated blood and marrow cells in genetic disorders. *Hum.Pathol.* 1: 99-124, 1970.
4. DARTE, J.M.; DACIE, J.V. & McSORLEY, J.G.A. - Pelger-like leucocytes in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 12: 117-124, 1954.
5. DORR, A.D. & MOLONEY, W.C. - Acquired pseudo-Pelger anomaly of granulocytic leukocytes. *N.Engl.J.Med.* 261(15): 742-746, 1959.
6. FISHBEIN, J. & FALLETTA, J.M. - Pelger-Huët anomaly in an infant with multiple congenital anomalies. *Am.J.Hematol.* 38:240-242, 1991.
7. HAYHOE, F.G.J. & FLEMANS, R.J. - *Haematological cytology.* 2º Ed. Wolfe Medical Publications, 1982, p. 93.
8. HECKNER, F.; LEHMANN, H.P. & KAO, Y.S. - *Hematologia microscópica prática.* Santos, 3º Ed. São Paulo, 1991, p. 58, 61.
9. HOFFBRAND, A.V. & PETTIT, J.E. - *Hematologia clínica ilustrada. Manual e atlas colorido.* Robe, São Paulo, 1988, p.7.2, 9.12, 9.14.
10. KLEIN, A.; HUSSAR, A.E. & BORNSTEIN, S. - Pelger-Huët anomaly of the leukocytes. *N.Engl.J.Med.* 253(24): 1057-1062, 1955.
11. LANZKOWSKY, P.; COLUSSI, P. & MCKENZIE, D. - Pelger-Huët anomaly of the granulocytes in a Cape Colored family. *J.Pediatr.* 67(5): 826-832, 1965.
12. LUDDEN, T.E. & HARVEY, M. - Pelger-Huët anomaly of leukocytes. *Am.J.Clin.Pathol.* 37(3): 302-304, 1962.
13. McDONALD, G.A.; DODDS, T.C. & CRUICKSHANK, B. - *Atlas de hematologia.* Toray, Barcelona, 1982, p. 71-72.
14. MIALE, J.B. - *Laboratory medicine Hematology.* C.V.Mosby, 6º Ed. St Louis, 1982, p.157, 160-161, 192, 205, 727.
15. O'CONNOR, B.H. - *A color atlas and instruction manual of peripheral blood cell morphology.* Williams & Wilkins, Baltimore, 1984, p. 263-264.
16. OSKI, F.A. & NAIMAN, J.L. - *Hematologia do recém-nascido.* 3º Ed. Manole. São Paulo, 1984, p.244-245.
17. ROSEIRO, A.M.; MACHADO, P.E.A.; ROSÁRIO, H.B.; GOTARDI, L. & FERNANDES, R.E. - Estudo de duas famílias de Botucatu-SP portadoras de anomalia de Pelger-Huët. *Genética, morfologia celular, aspectos funcionais.* LAES/HAES. 63: 44-48, 1990.
18. RUTLLANT, M.LI.; GIMFERRER, E.; AYATS, R. & MADOZ, P. - *Licenciatura. Hematologia.* Salvat, Barcelona, 1988, p.121.
19. SANS-SABRAFEN, J.; COFINO, R.C.; RODÉS, R.L.; PARDO-PERET, P.; CORRONS, J.L. & CASAS, S.W. - *Hematologia clínica.* Doyma, Barcelona, 1982, p. 409-410.
20. SHANBROM, E.; COLLINS, Z. & MILLER, S. - "Acquired" Pelger-Huët cells in blood dyscrasias. *Am.J.Med.Sci.* 240:732-737, 1960.

21. SIMMONS, A. - *Hematology. A combined theoretical & technical approach*. W.B.Saunders. Philadelphia, 1989, p.115.
22. SKENDZEL, L.P. & HOFFMAN, G.C. - The Pelger anomaly of leukocytes: forty-one cases in seven families. *Am.J.Clin.Pathol.* 37(3): 294-301, 1962.
23. THOMPSON, M.T.; McINNES, R.R. & WILLARD, H.F. - *Genética médica*. 5ª Ed. Ed. Guanabara. Rio de Janeiro, 1993, p. 42-47.
24. UNDRITZ, P.E. - Les malformations héréditaires des éléments figurés du sang. *Sang.* 25: 296-324, 1954.
25. WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E. ERSLEV, A.J. & LICHTMAN, M.A. - *Hematology*. McGraw-Hill Book Company, 3ª Ed. 1976, p.177, 723-724.

Recebido para publicação: 12.05.94

INFLUÊNCIA DO CONTROLE GLICÊMICO NA HIPERLIPEMIA DE MULHERES DIABÉTICAS (TIPO II)

MARTINS, H.P.*;
ODA, M.Y.N.**;
ZAMBONI***, I.M.;
CASTILHO, L.N.*

RIALA6/774

MARTINS, H.P.; ODA, M.Y.N.; ZAMBONI, I.M.; CASTILHO, L.N. — Influência do controle glicêmico na hiperlipemia de mulheres diabéticas (tipo II) *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 121-5, 1994.

RESUMO: Estudamos os níveis séricos de glicose, HbA1c, alfa2 e beta globulinas em 46 mulheres entre 51 e 70 anos, para observar sua correlação com o perfil lipídico no diabetes mellitus não insulino dependente, para tentar estabelecer uma associação entre a hiperlipemia e o controle glicêmico inadequado. Dentre os parâmetros estudados o colesterol total, o HDL-colesterol e os triglicérides se correlacionaram positivamente com a glicemia e as proteínas glicadas nos diabéticas tipo II, o que pode ressaltar o efeito da hiperglicemia no metabolismo lipídico. No nosso estudo houve uma diminuição de 20% nos níveis de HDL-Col. nas mulheres diabéticas quando comparadas com o grupo controle não diabético. Este decréscimo se acentua com a obesidade. Estas diabéticas apresentaram um nível pouco alterado de colesterol total, com média geral de 243 mg/dl com um risco maior para os problemas cardiovasculares. Observamos também um aumento de 2 vezes a média dos níveis de triglicérides, quando comparados com a população controle de mesmo sexo, idade e peso semelhantes.

DESCRIPTORES: Hiperglicemia; hiperlipemia; Diabetes mellitus.

INTRODUÇÃO

O risco de doenças cardiovasculares no diabetes está aumentado de 2 a 3 vezes, quando comparado com pessoas não diabéticas de mesma idade e sexo, podendo haver, ou não a participação de outros fatores de risco como por exemplo fumo e hipertensão arterial^{1,2,3}. O aumento deste risco atinge particularmente as mulheres^{4,5}.

No estudo de Framingham³, o risco relativo de morte por problemas cardiovasculares em diabéticos versus indivíduos não diabéticos foi de 2,1 para homens e 4,9 para mulheres.

A maioria dos estudos epidemiológicos, inclui a

maioria dos pacientes não insulino-dependentes (tipo II), mas um aumento do risco cardiovascular foi também observado nos insulino dependentes⁶ e constatou-se que em diabéticos juvenis, insulino dependentes com doenças coronarianas (CHD) a mortalidade aumentou rapidamente na terceira década da vida, e aos 55 anos chegou a 35% nos homens e mulheres^{7,8}.

Embora o diabetes pareça ser um fator de risco independente, anomalias no metabolismo lipídico também contribuem para um risco cardiovascular maior nos diabéticos^{7,8,9,10,11}. Assim a quantificação do colesterol sérico tem sido um dado importante na avaliação do risco nas doenças coronarianas (CHD). Segundo West e colaboradores¹¹, diabéticos com níveis

* Pesq., Científicas;

** Biologista;

*** T.E.Pesq.Científica do Inst. Adolfo Lutz

de colesterol maiores que 245 mg/dl têm uma mortalidade cardiovascular duas vezes maior quando comparada com aqueles que apresentam níveis menores que 180 mg/dl. Em diabéticos com doenças coronarianas (CHD) há um aumento nas lipoproteínas totais e LDL-colesterol e uma diminuição do HDL-colesterol muito mais frequente do que nos diabéticos sem CHD^{12,13}. Uma explicação proposta para o aumento de risco cardiovascular em mulheres diabéticas comparado com os homens é o efeito adverso maior nos níveis de lipídicos e lipoproteínas nas mulheres¹⁵.

A prevalência de hiperlipemia em diabéticos não insulino dependentes é de duas ou três vezes maior que na população normal¹⁸. A anomalia mais comum é a elevação dos níveis de triglicérides plasmáticos, que ocorre em 10 a 20% dos pacientes com diabetes tipo II. Um aumento de 2 vezes na média dos níveis de triglicérides foi observado em diabéticos tipo II quando comparados com a população não diabética^{19,20}. Este aumento dos níveis de triglicérides plasmáticos pode ocorrer com as mudanças precoces no metabolismo da glicose, mesmo quando os indivíduos são assintomáticos para o diabetes²¹. Outra anomalia comum nas lipoproteínas de diabéticos não insulino-dependente é a diminuição dos níveis de HDL-colesterol cerca de 30% menor do que o grupo controle não diabético de mesmo sexo e idade; este decréscimo não é acompanhado na obesidade¹⁷. O efeito do diabetes nos níveis de HDL é maior nas mulheres do que nos homens^{15,16}. Os diabéticos tipo II não apresentam um nível alterado de colesterol total e a maioria dos estudos não encontram LDL-colesterol elevado quando comparado com não diabéticos de mesmo sexo, idade e peso. Poucos estudos têm examinado o efeito do controle glicêmico do diabético com os níveis de lipoproteínas, não associando os ganhos ou perdas de peso e a composição da dieta. A perda de peso resulta numa melhor tolerância à glicose e numa diminuição dos níveis plasmáticos do colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides e é difícil determinar se o efeito benéfico nas lipoproteínas se deve ao controle melhor do diabetes ou a perda de gorduras corporais²².

Em resumo, as anomalias mais comuns no perfil lipídico dos diabéticos Tipo II são a elevação do nível dos triglicérides devido ao aumento da VLDL e o decréscimo de HDL-colesterol. Os triglicérides elevados geralmente respondem ao controle da hiperglicemia enquanto o decréscimo dos níveis de HDL-colesterol nem sempre ocorre. Perda de peso em pacientes obesos e a insulino terapia são mais efetivos no aumento dos níveis de HDL-colesterol. A sulfoniluréia tem um efeito benéfico menor nos níveis de HDL colesterol e a metformina pode diminuir os níveis de LDL-colesterol independente do seu efeito hipoglicemiante^{33,35}.

Pacientes insulino dependentes com um "ótimo" controle metabólico tem níveis lipídicos similares

aos controles não diabéticos de mesma idade e sexo²⁵. O efeito do controle com insulina nos níveis de HDL é variável. Alguns estudos apresentam níveis de HDL normais em diabéticos tipo I quando comparados com sujeitos controles^{15,23} e outros consideram as elevações de HDL-colesterol modestas^{15,24,25}.

Neste trabalho comparamos os resultados obtidos na determinação de diversos catabólitos plasmáticos em mulheres diabéticas tipo II (menopausadas) com um grupo normal correlacionando-as, a fim de ressaltar a importância do controle metabólico tentando prevenir os fatores de risco cardiovascular.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 46 amostras de sangue de mulheres diabéticas menopausadas tipo II (não insulino dependentes) com idades variando de 51 a 74 anos, enviadas ao Instituto Adolfo Lutz pelos Centros de Saúde do ERSA I. Examinamos, também 30 amostras de sangue em mulheres menopausadas não diabéticas na mesma faixa etária, consideradas como normais.

A análise bioquímica obedeceu as seguintes determinações: glicose, método enzimático da Abbott; glicohemoglobina, método da separação cromatográfica em resina de troca iônica da Labtest; HDL-colesterol total e triglicérides pelo método enzimático da Abbott, as proteínas séricas foram separadas por eletroforese em "cellogel", tampão barbital 0,01M pH 8,6 e a quantificação das frações determinada por densitometria. As proteínas totais foram determinadas pela clássica reação do biureto, usando-se como padrão a soro albumina humana da Sigma.

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

RESULTADOS

Os resultados obtidos (m.d.p.) das análises bioquímicas efetuadas nos grupos controle (N) e diabéticos (D), assim como a análise estatística encontram-se na Tabela 1. Na Tabela 2 encontramos os diferentes coeficientes de correlação entre as diversas determinações bioquímicas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O tratamento dos pacientes diabéticos tipo II tem efeitos variáveis nas anomalias das lipoproteínas dependendo se os pacientes são obesos ou não, se perdem peso durante o controle e se o tratamento inicial

TABELA 1

Valores séricos médios obtidos nas análises bioquímicas efetuadas em menopausadas normais (n=30) e diabéticas (n=46).

	Glicose (mg/dl)	HbA1c %	Coolest. (mg/dl)	HDL-Col. (mg/dl)	Triglic. (mg/dl)	P.T. g%	Alfa2G' g%	Beta G'' g%
N	97,18	6,71	182,07	50,85	225,63	7,46	0,60	,88
"t"	NS#	NS#	NS#	S##	NS#	NS#	NS#	NS#
D	248,34	10,97	234,27	36,37	410,20	7,38	0,74	1,20
"t"	NS#	S##	S##	S##	NS#	NS#	NS#	NS#
S.D.*	24,09	1,51	42,94	11,27	57,49	1,41	0,18	0,37
D.##	83,42	3,05	69,43	12,38	344,41	1,55	0,30	0,41

teste "t" de Student
 '= alfa2globulinas
 ''=betaglobulina

NS# = siginificante

NS## = não siginificante

TABELA 2

Correlação entre os níveis de glicose e demais parâmetros utilizados no controle metabólico em mulheres menopausadas normais (N) e diabéticas (D).

	HbA1c	Coolest.	HDL-col.	Triaglic.	PT	Alfa G	Beta G
Glicose	r*=-,951 r**=-,496	r*=-,768 r**=-,163	r*=-,608 r**=-,274	r*=-,503 r**=-,374	r*=-,961 r**=-,493	r*=-,714 r**=-,379	r*=-,641 r**=-,413

p<0,05 Normal ** Diabético

foi com sulfoniluréia, metformina ou insulina^{26,27}. A perda de peso pode resultar numa melhor tolerância à glicose e numa diminuição dos níveis plasmáticos do colesterol, LDL-colesterol e triglicérides e fica difícil determinar se o efeito benéfico nas lipoproteínas se deve ao melhor controle da diabetes ou a perda de gorduras corporais^{22,28}.

Quando comparamos os resultados obtidos com o sangue das mulheres em menopausa e diabéticas com as normais encontramos níveis de coeficiente de correlação(r) diferentes entre a glicemia e os diversos lípidos nas diabéticas o que diferiu das normais (Tabela 2).

A nossa amostragem de mulheres diabéticas apresentou uma alteração no nível de triglicérides de cerca de duas vezes maior que a média das mulheres normais. Quando separamos as proteínas plasmáticas notamos (Tabela 1) que a média das frações alfa2 e beta globulinas era maior nas mulheres diabéticas, demonstrando um aumento na concentração das frações protéicas carregadoras de lípidos.

Assim, as anomalias mais comuns dos lípidos nas diabéticas não insulino dependentes foram a elevação do nível de triglicérides séricos (devido ao aumento do VLDL) e o decréscimo do HDL-colesterol. Os níveis séricos de triglicérides elevados geralmente respondem ao controle da hiperglicemia enquanto o decréscimo dos níveis séricos de HDL-colesterol nem sempre respondem a essa terapia. A perda de

peso em pacientes obesos e a insulino terapia tem se mostrado mais eficiente no aumento dos níveis de HDL-colesterol. A metformina pode diminuir os níveis de LDL-colesterol independentemente de seu efeito hipoglicemiante. A sulfoniluréia não tem efeito benéfico nos níveis de HDL-colesterol.

Os níveis plasmáticos de LDL-colesterol em diabéticos não insulino dependentes estão geralmente dentro da normalidade mesmo quando anomalias múltiplas do metabolismo do LDL sejam descritas. O mecanismo responsável pela remoção deficiente do LDL-colesterol parece ser devido em parte pela glicação da LDL, ocorrendo a diminuição do seu catabolismo via receptor³⁶ sendo captada preferencialmente por macrófagos da parede arterial²².

Podemos concluir que a hipertrigliceridemia nos diabéticos não insulino dependente é causada pela super produção²⁹ e pelo "clearance" prejudicado do VLDL-TG^{30,31}. O mecanismo da superprodução do VLDL-TG pode ser na maioria dos casos devido ao aumento do fluxo de glicose e dos ácidos graxos livres pelo fígado³². O aumento da produção do VLDL-apoB também pode ocorrer mas se deve mais a obesidade do que ao diabetes³³. O mecanismo mais aceito sobre a ação da insulina seria o seu efeito permissivo na produção de triglicérides. O "clearance" diminuído dos triglicérides pode ser devido a diminuição da atividade lipase lipoproteica³⁴, retardando o catabolismo dos quilomicrons³⁵.

RIALA6/774

MARTINS, H.P.; ODA, M.Y.N.; ZAMBONI, I.M.; CASTILHO, L.N. — Influency of hyperlipidemia in diabetics women (type II) *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 121-5, 1994.

ABSTRACT: Glycohemoglobin, glucose, lipids, alfa e beta globulins were measured in 46 woman type II diabetics. We investigated the influence on the plasma glucose in comparison with the concentration of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides, avoid increase the risk of atherosclerosis in patients with poor metabolic control. The correlation was positively between glucose levels in patients diabetics non insulin dependents and cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides and can suggest the hyperglycemic effect in the lipidic metabolism. The effect of diabetes on HDL levels is greater in women than in men and our study suggest 20% lower than in age and sex-matched non diabetics, and this decrease in HDL-cholesterol cannot be accounted for by obesity. This diabetics type II generally has little effect on total cholesterol levels with media of 243 mg/dl, also contribute to the observed excess in cardiovascular risk in diabetics. Even in those individuals without frank hyperlipidemia, increases in plasma triglycerid levels are observed.

DESCRIPTORS: Hyperglycemy, Hiperlipedemy, Diabetes Mellitus

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSMAN, G. & SCHULTE, H.: "The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: Prevalence of hiperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease". *Am. Heart. J.* 116:1713-, 1988.
2. GARCIA, M.J., ET AL.: "Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow up study". *Diabetes* 23:105-, 1974.
3. KANNEL, W.B. & McGEE, D.L.: "Diabetics and cardiovascular disease. The Framingham Study", *Jama* 241:2035-, 1979.
4. GORDON T. ET AL.: "Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study". *Ann. Intern. Med.* 83:393-, 1977.
5. BARRETT-CONNOR, E & WINGARD, D.L.: "Sex differential in ischemia heart disease mortality in diabetics: A prospective population-based study" *Am.J.Epidemiol.* 118:489-, 1983.
6. KROLEWSKI, A.S. ET AL. "Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin dependent diabetes mellitus". *Am.J.Cardiol.* 59:750-, 1987.
7. FONTBONNE, A. ET AL. "Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes: Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study". *Diabetologia* 32:300-, 1989.
8. STANTEN, R.J. ET AL.: "Atherosclerosis in diabetes mellitus. Correlations with serum lipid levels, adiposity, and serum insulin level". *Arch.Intern.Med.* 130: 833-, 1972.
9. VUSITUPA, M.I.J. ET AL.; "The relationship of cardiovascular risk factors to the prevalence of coronary heart disease in newly diagnosed type 2 (non-insulin dependent) diabetes". *Diabetologia* 28: 653-, 1985.
10. VUSITUPA, M.I.J.: "Five-year incidence of atherosclerotic vascular disease in relation to general risk factors, insulin level, and abnormalities in lipoprotein composition in non-insulin-dependent diabetic and non diabetic subjects". *Circulation* 82:27-, 1990.
11. WEST, K.M. ET AL.: "The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other "risk factors" as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO multinational study". *Diabetes Care* 6: 361-, 1983.
12. LAAKSO, M. ET AL.: "Lipid and lipoprotein abnormalities associated with coronary heart disease in patients with insulin-dependent diabetes mellitus". *Atherosclerosis* 6: 679-, 1986.
13. LAAKSO, M. ET AL.: "Association of low HDL and HDL-2-cholesterol with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetics". *Atherosclerosis* 5: 653-, 1985.
14. BEACH, K.W. ET AL.: "The correlation of arteriosclerosis obliterans with lipoproteins in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes". *Diabetes* 28: 836, 1979.
15. WALDEN, C.E. ET AL.: "Sex differences in the effect of diabetes mellitus on lipoprotein triglyceride and cholesterol concentrations". *N.Engl.J.Med.* 311: 953-, 1984.
16. BERGMANN, M.; GIDEZ, L.I. & EDER, H.A.: "High-density lipoprotein subclasses in diabetes". *Am.J.Med.* 81:488-1986.
17. BARRETT-CONNOR, E. WITZTUM, J. & HOLBROOK, M.: "A community study of high density

- lipoproteins in adult noninsulin-dependent diabetics". *Am.J.Epidemiol.* 117:186-192, 1983.
18. BASSO, L.V. & HAVEL, R.J.: "Hepatic metabolism of free fatty acids in normal and diabetic dogs". *J.Clin.Invest.* 49:537-, 1970.
19. BARRETT-CONNOR, E.; GRUNDY, S.M. & HOLD-BROOK, M. "Plasma lipids and diabetes mellitus in an adult community". *Am.J.Epidemiol.* 115:657-, 1982.
20. BRIONES, E.R.; MAO, S.J.T. & PALUMBO, P.M.: "Analysis of plasma lipids and apolipoproteins in insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes". *Metabolism* 33:42-, 1984.
21. LAAKSO, M. & BARRETT-CONNOR, E.: "Asymptomatic hyperglycemia is associated with lipid and lipoprotein changes favoring atherosclerosis". *Arteriosclerosis.* 9:665-, 1989.
22. HOWARD B.V.; ET AL.: "Changes in plasma lipoproteins accompany diet therapy in obese diabetics". *Atherosclerosis* 33:445-, 1979.
23. SOSENKO, J.M. ET AL.: "Hyperglycemia and plasma lipid levels. A prospective study of young insulin-dependent diabetic patients". *N.Engl.J.Med.* 302:650, 1980.
24. NIKKILA, E.A.: "High density lipoproteins in diabetes". *Diabetes* 30(suppl.2):82-, 1981.
25. ECKEL, R.H. ET AL.: "High density lipoprotein composition in insulin-dependent diabetes mellitus". *Diabetes* 30: 132-, 1981.
26. PAISEY, R. ET AL.: "The effects of chlorpropamide and insulin on serum lipids, lipoproteins and fractional triglycerides removal". *Diabetologia* 15:81-, 1978.
27. TAYLOR, K.G. ET AL.: "A prospective study of the effects of 12 months treatment on serum lipids and apolipoproteins A-I and B in type 2 (noninsulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 23:507-, 1982.
28. KENNEDY, L. ET AL.: "The effect of intensive dietary therapy on serum high-density lipoprotein cholesterol in patients with type II (noninsulin-dependent) diabetes mellitus. A prospective study. *Diabetologia* 23: 24-, 1982.
29. ABRAMS, J.; GINSBERG, H. & GRUNDY, S.: "Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic diabetes mellitus". *Diabetes* 31:903-, 1982.
30. DUNN, F.L. ET AL.: "The effect of diabetic control on very low-density lipoprotein triglyceride metabolism in patients with type II diabetes and marked hypertriglyceridemia". *Metabolism* 33:117-1984.
31. KISSEBAH, A.H. ET AL.: "Plasma low-density lipoprotein transport kinetics in noninsulin - dependent diabetes mellitus". *J.Clin.Invest.* 71:655, 1983.
32. HOWARD, H.V. ET AL. "Very low density lipoprotein triglyceride metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Relationship to plasma insulin and free fatty acids. *Diabetes* 32:271-, 1983.
33. TASKINEN, M.R. ET AL.: "Effects of NIDDM on very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B metabolism. Studies before and after sulfonylurea therapy". *Diabetes* 35: 1268-, 1986.
34. BRUNZEL, J.D.; PORTE, D.J. & BIERMAN, E.L.: "Abnormal lipoprotein-lipase-mediated plasma triglyceride removal in untreated diabetes mellitus associated with hypertriglyceridemia". *Metabolism* 28:901-, 1979.
35. HAFFNER, S.M. ET AL.: "Retarded chylomicron apolipoprotein B catabolism in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects with lipaemia". *Diabetologia* 26: 349-, 1984.
36. GARG, A. & GRUNDY, S.M.: "Nicotinic acid may not be first line therapy for dyslipidemia in non insulin-dependent diabetes mellitus". *Clin. Res.* 37: 449-, 1989.

Recebido para publicação: 28.06.94.

TEOR DE NITRATO E NITRITO EM VEGETAIS CULTIVADOS NO DISTRITO FEDERAL: UM ESTUDO PRELIMINAR

Susanne RATH .
Maria I. N. XIMENES *
Felix G.R. REYES **

RIALA6/775

RATH, S.; XIMENES, M.I.N.; REYES, F.G.R. — Teor de nitrato e nitrito em vegetais cultivados no distrito federal: um estudo preliminar. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 54(2): 126-130, 1994.

RESUMO: Amostras de alface, couve e espinafre cultivadas no Distrito Federal foram analisadas quanto ao teor de nitrato e nitrito. A determinação do nitrito foi baseada no método de Follett e Ratcliff, reação com ácido sulfanílico e 1-naftol e determinação espectrofotométrica, em 474 nm, do azo composto formado. O nitrato foi determinado de maneira semelhante após redução a nitrito em coluna de cádmio. De 26 amostras analisadas, 84% apresentaram um teor de nitrato acima de 500 mg/kg e 58% acima de 1000 mg/kg. O maior valor encontrado foi de 2881 mg de nitrato de sódio/kg em uma amostra de couve. Nitrito não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. O limite de determinação do método foi de 20 e 16 mg/kg de amostra para nitrato de sódio e nitrito de sódio, respectivamente.

DESCRITORES: nitrato e nitrito em vegetais, alface, espinafre e couve.

INTRODUÇÃO

Os nitratos e nitritos encontram-se naturalmente distribuídos no meio ambiente em decorrência do ciclo do nitrogênio. Na decomposição microbiológica de proteínas ocorre a produção do íon amônio, que, por sua vez, pode ser oxidado na presença de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* a nitrito e nitrato, respectivamente. Além disto, as atividades industriais e agrícolas contribuem significativamente para o aumento de compostos nitrogenados, inclusive nitratos, tanto na água, e solo, como ar atmosférico^{1,4,19}.

Os nitratos assimilados pelas plantas, através de compostos nitrogenados, são essenciais para o desenvolvimento das mesmas, pois representam uma fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas celulares. O teor de nitrato, além de variar com a genética da espécie vegetal^{1,6,7,16} e com as condições climáticas como intensidade de luz, principalmente no período

de maturação, temperatura²⁰, etc, podem sofrer variações em decorrência da ação do homem sobre o meio ambiente. O uso abusivo de fertilizantes e produtos químicos durante o cultivo contribuem para o aumento do acúmulo de nitratos pelas plantas^{2,4,22}.

A presença de nitritos deve-se principalmente à ação de bactérias nitrificantes sobre o nitrato. Este processo pode ser acelerado durante um armazenamento inadequado dos produtos, onde fatores como temperatura, tempo de estocagem e umidade são determinantes¹⁷. A redução do nitrato a nitrito pode tanto ocorrer nas hortaliças frescas como nas submetidas a um processo de cocção^{14,15}.

Entre os vegetais que podem apresentar elevado teor de nitrato, algumas vezes superior a 3000 mg/kg, destacam-se o espinafre, a beterraba, o rabanete, a beringela, o aipo, o nabo, a cenoura, o alface e a couve⁹. LARA e TAKAHASHI⁶ verificaram a pre-

Departamento de Química, Universidade de Brasília - Brasília/DF

* Instituto de Saúde do Distrito Federal - Brasília/DF

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

sença de 5896 mg de nitrato/kg, expressos em nitrato de sódio, em uma amostra de couve coletada no estado de São Paulo.

Além do nitrato ser um componente natural presente em vegetais seu emprego associado ao nitrito, na produção de alimentos é bastante antigo. Os sais de sódio e potássio tem sido largamente utilizados como aditivos alimentares em produtos cárneos curados⁸, seja por suas características antioxidantes e de fixação da cor rósea da carne, seja pelo seu poder antimicrobiano para inibir o crescimento do *Clostridium botulinum* responsável pela toxina que causa o botulismo.

Do ponto de vista toxicológico, os nitratos e nitritos, uma vez ingeridos, contribuem para a formação endógena de N-nitrosaminas, compostos potencialmente carcinogênicos, assim como são capazes de transformar a hemoglobina do sangue em ferriemoglobina, processo esse que leva ao impedimento do transporte do oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos. Enquanto este mecanismo é reversível em pessoas adultas, pode levar lactentes à morte, principalmente crianças com menos de três meses de idade, por apresentarem deficiência fisiológica transitória da metemoglobina redutase ou de seu co-fator NADH^{1,12}.

O limite tolerado de nitrito e nitrato como aditivo alimentar depende, em particular, do produto alimentício, assim como da legislação vigente de cada país. Segundo a legislação brasileira o uso de nitrato e nitrito de sódio ou potássio é permitido até um valor máximo de 0,05 g/100g, sendo que no produto a ser consumido não poderá remanescer mais de 0,02 g/100g de nitrito (expresso em fon nitrito)⁸.

O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu para o nitrato uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0-5 mg/kg de peso corpóreo (calculada como nitrato de sódio)²³ e uma IDA temporária de 0-0,2 mg/kg de peso corpóreo para o nitrito (como nitrito de sódio)^{23,24}. Tendo recomendado não adicionar nitrito nos alimentos destinados a crianças com menos de seis meses de idade²⁴.

Segundo KNIGHT et alii⁵, as fontes principais de ingestão de nitrato pelo homem são os vegetais, chegando a representar 90% do total ingerido. Este valor varia de acordo com os hábitos alimentares característicos de cada região.

Uma vez que, em geral, as hortaliças desempenham um papel importante na dieta alimentar, principalmente na dieta infantil, e considerando a complexidade da interação de fatores, ainda não totalmente esclarecidos, que propiciam o acúmulo de nitratos nos vegetais, surge a necessidade do estudo e controle de nitratos nos locais de cultivo, afim de

que sejam produzidos vegetais com baixos teores de nitratos, minimizando assim o potencial de risco à saúde pela exposição a essas substâncias. O presente estudo teve como propósito determinar os níveis de nitrato e nitrito em amostras de alface, couve e espinafre cultivados na região do Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 26 amostras, sendo 9 de couve, 9 de alface e 8 de espinafre, no período de março a abril de 1993. As amostras foram coletadas, a acaso, em locais de venda do Distrito Federal. A metodologia utilizada segue o esquema da figura 1.

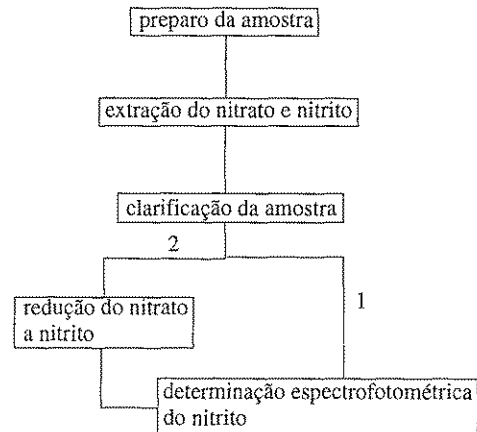


FIGURA 1

Fluxograma do roteiro analítico. (Página 6)

1. Determinação de nitrito
2. Determinação de nitrato e nitrito na forma de nitrito total

Preparo da amostra

Apenas as partes comestíveis de cada espécie foram analisadas. Para tanto, as folhas foram lavadas em água corrente, secadas com papel absorvente e posteriormente trituradas até a obtenção de uma massa homogênea.

Extração do nitrato e nitrito

5,0 g do homogeneizado foram misturados com 80 ml de NaCl 0,9%. A solução foi aquecida em banho maria a 100°C por um período de 30 minutos. O volume final foi levado a 100 ml com água destilada.

Clarificação da amostra

A solução foi filtrada e clarificada com 25 ml de creme de alumina. Após este procedimento a amostra foi novamente filtrada.

Determinação do nitrato e nitrito

A determinação do nitrato foi realizada após a sua redução a nitrito. Para tanto, 5,0 a 40,0 ml do extrato clarificado, dependendo do teor de nitrato na amostra original, foram passados por uma coluna de cádmio⁷, cuja eficiência foi testada previamente. O eluído da coluna foi levado a 100 ml com água destilada. O nitrito formado foi determinado espectrofotometricamente segundo FOLLETT & RATCLIFF³. A determinação do nitrito seguiu o mesmo procedimento, porém utilizando 5,0 a 40,0 ml do extrato clarificado sem a sua passagem na coluna redutora (rota I, fig. 1). O teor de nitrato foi calculado pela diferença dos valores de nitrito obtidos com e sem o emprego da coluna de cádmio.

Análise espectrofotométrica

A 10,0 ml da solução anteriormente obtida foram adicionados 5,0 ml de tampão amoniacal pH 9,6 e 10,0 ml de ácido sulfanílico com 1-naftol. A solução foi deixada em repouso por 30 min a uma temperatura de 30°C. A concentração de nitrito e nitrato, na forma de nitrito de sódio, foi determinada através de uma curva de calibração, medindo-se a absorbância do azo composto formado na região do visível em 474 nm.

O preparo da amostra e a extração do nitrato e nitrito foram realizados segundo a metodologia proposta por LIN e YEN¹⁰, com a seguinte modificação: no processo de clarificação usou-se o creme de alumina conforme sugerido pelo Instituto Adolfo Lutz¹³ para a análise de nitritos, em substituição a coluna de alumina como proposta pelos autores, uma vez que na coluna foi verificada a coeluição de pigmentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação de nitrato foi avaliada mediante a adição padrão de nitrato em amostras de alface. Em cinco replicatas obteve-se um valor médio de 91,6 ± 1,1%. A recuperação não total do nitrato, provavelmente ocorreu devido a perda na etapa de clarificação. Segundo USHER & TELLING²¹ pode ocorrer a oclusão do nitrato com a alumina do agente clarificante, sendo que a extensão da oclusão depende da quantidade de alumina utilizada.

O limite de determinação¹¹ do método foi de 20 mg de nitrato de sódio/kg de amostra fresca, para 5,0 g de amostra inicial, equivalente a 0,0397 µg de nitrito de sódio/ml de solução na curva de calibração espectrofotométrica. No caso no nitrito o mesmo foi de 16 mg/kg de amostra.

Os resultados das análises de amostras de alface, couve e espinafre, expressos em nitrato de sódio, estão apresentados na tabela 01.

TABELA 01.
Teores de nitrato, expressos como nitrato de sódio, em amostras frescas de couve, espinafre e alface

Vegetal	NaNO ₃ /mg.Kg-1					
	Alface		Couve		Espinafre	
Amostra	x	d _r	x	d _r	x	d _r
1	2223	6,25	1144	3,51	856	7,53
2	1131	5,88	993	9,28	917	1,76
3	783	2,51	1109	4,88	813	1,81
4	401	0,59	782	6,70	1276	2,97
5	2554	2,56	445	0,53	1115	1,09
6	2485	1,07	590	3,62	1009	8,64
7	2824	0,78	368	1,54	1100	6,41
8	2595	3,04	2881	3,52	1249	2,58
9	1389	0,88	nd			...
x de todas as determinação	1820		924		1042	

\bar{x} : Valor médio de 3 determinações;
d_r: Desvio médio relativo em partes por cem;
nd: Abaixo do limite de detecção do método;

Enquanto que para o alface, de 9 amostras 5 apresentaram um teor de nitrato de sódio acima de 2000 mg/kg, de 9 amostras analisadas de couve apenas uma amostra superava este valor. Já para o espinafre nenhuma das amostras analisadas continha um teor de nitrato de sódio superior a 1500 mg/kg. O maior valor de nitrato, 2881 mg/kg, foi encontrado em uma amostra de couve.

Os valores médios de nitrato encontrados nas amostras de couve e espinafre são menores do que aqueles relatados por LARA & TAKAHASHI⁶ em amostras coletadas em 1982 em São Paulo (1975 mg/kg e 2030 mg/kg para couve e espinafre, respectivamente). Já as amostras de alface coletadas no Distrito Federal apresentaram teores mais elevados (valor médio de 1820 mg/kg) quando comparados com os valores obtidos em São Paulo (valor médio de 1245 mg/kg)⁶.

Nas hortaliças frescas analisadas não foi detectada a presença de nitrito (limite de detecção 4,8 mg de nitrito de sódio/kg de amostra). No entanto, quando a amostra homogeneizada, era deixada em repouso, à temperatura ambiente, por um período de 24 horas, pode-se verificar a conversão do nitrato a nitrito em todas as espécies sob estudo, chegando a 30% nas amostras de alface, 50% nas de couve e até 80% nas amostras de espinafre. A redução do nitrato a nitrito pode ser explicada tanto pela atividade da enzima nitrato-redutase quanto pela presença de microorganismos nitrificantes presentes no homogenizado do vegetal em questão.

As variações de nitrato nas amostras analisadas,

indicam a necessidade de um estudo sobre a correlação dos teores de nitrato com fatores externos, principalmente no que se refere ao uso de fertilizantes empregados no cultivo das hortaliças consumidas na região.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto de Saúde do Distrito Federal pelo apoio técnico e financeiro a esse trabalho.

RIALA6/670

RATH, S.; XIMENES, M.I.N.; REYES, F.G.R. — Nitrate and Nitrite in vegetable cultivated at Distrito Federal: preliminary study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 126-130, 1994.

ABSTRACT: Nitrate and nitrite were determined in samples of lettuce, cabbage and spinach produced at the region of the Distrito Federal. Nitrite was determined by the method of Follett & Ratcliff, spectrophotometric determination at 474 nm of the diazo compound formed after reaction of nitrite with sulphamyl acid and 1-naphthol. Nitrate was similarly determined after its reduction to nitrite by using a cadmium column. Of 26 samples analyzed, 84% presented a level of nitrate over than 500 mg/kg and 58% greater than 1000 mg/kg. The highest value of nitrate was 2881 mg/kg obtained in a sample of cabbage. Nitrite was not detected in any of the samples analyzed. The limit of determination of the method was 20 mg/kg and 16 mg/kg for sodium nitrate, respectively.

DESCRIPTORS: Nitrite and Nitrite in vegetable; Lettuce; Spinach and Cabbage.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, A.C.P. & MIDIO, A.F. Nitratos, Nitritos e Compostos N-nitrosos em Alimentos: Onde está o Problema? *Ciencia e Cultura* 40: 947-956, 1989.
2. BERESNIEWICZ, A. DUDEK, K. & NOWOSIELSKI, O. The Use of Triamide Phosphoryl (TAP) as NP Fertilizer for Nitrate Level Control in Lettuce and Tomato Transplants. *Acta Hort.* 222: 207-211, 1988.
3. FOLLETT, M.J. & RATCLIFF, P.W. Determination of Nitrite and Nitrate in Meat Products. *J. Sci. Food Agric.* 14:138-144, 1963.
4. GRYLLS, J.P. Effect of Nitrogen Fertilizer type and Nitrification Inhibitor on the Nitrate Content of Glasshouse Lettuce. *Acta Hort.* 222:189-181, 1988.
5. KNIGHT, T.M.; FORMAN, D.; AL-DABBAGH, S.A. & DOLL, P. Estimation of Dietary Intake of Nitrate and Nitrite in Great Britain. *Ed. Chem. Toxic.* 25:277-85, 1987.
6. LARA, W.H. & TAKAHASHI, M.Y. Níveis de Nitratos em Hortaliças. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1-2): 53-57, 1982.
7. LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. & YABIKU, H.Y. Níveis de Nitratos em Alimentos Infantis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:147-152, 1980.
8. LARA, W. H.; TAKAHASHI, M.I. & SILVEIRA, N. Determinação de Nitrito e Nitrato em Conservas de Carnes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:161-6, 1978.
9. LEDERER, J., *Enciclopédia Moderna de Higiene Alimentar - Intoxicações Alimentares*, Vol. 4, Editora Manole Dois Ltda., São Paulo, 1991.
10. LIN, J.K. & YEN, J.Y. Changes in the Nitrate and Nitrite Contents of Fresh Vegetables During Cultivation and Post-harvest Storage. *Food. Cosmet. Toxicol.* 18:597-603, 1980.
11. MILLER, J.C. & MILLER, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry*, New York, John Wiley & Sons, 1984, 96-100.
12. MUTSCHLER, E. *Arzneimittelwirkung, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 5. Aufl., Stuttgart, Wissenschaftlicheverlagsgesellschaft mbH, 1986.
13. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 3 ed., São Paulo, Editora Débora D. Estrela Rebocho, 1985, 101.
14. OLMEDO, R.G. & BOSCH, N.B. Aspectos Toxicológicos da Presença de Nitratos y Nitritos en los Productos Horticolas Cocidos y en su Agua de Coccion. *Alimentaria*, 25:71-75, 1988.
15. OLMEDO, R.G. & BOSCH, N.B. Ingestion de Nitratos Procedentes de Productos Horticolas y su Incidencia Toxicologica. *Alimentaria*, 25:76-78, 1988.
16. OMS/OPAS Criterios de Salud Ambiental, vol. 5 Nitrates, Nitrites y Compuestos de N-Nitroso, 1980.
17. PHILLIPS, W.E.J. Changes in the Nitrate and Nitrite Contents of Fresh and Processed Spinach During Storage. *J. Agr. Food Chem.* 1:88-91, 1968.

18. Resolução nº 04 de 24 de Nov. 1988 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.
19. STRAUSS, D. *Chemie für die Pharmazeutische Praxis*, 4 ed., Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1985, 104-107.
20. TACHIBANA, S. The influence of Root Temperature on Nitrate Assimilation by Cucumber and Fiddlehead Gourd. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 57:440-447, 1988.
21. USHER, C.D. & TELLING, G.M. Analysis of Nitrate and Nitrite in Foodstuffs: A Critical Review *J. Sci. Food Agric.* 2:1793-1805, 1975.
22. VAN DER BOON, J. STEENHUIZEN, J. & STEIN-GROVER, G. Growth and Nitrate concentration of Lettuce as Affected by Total Nitrogen and Chloride Concentration, NH₄/NH₃ ratio and Temperature of the Recirculating Nutrient Solution *J. Hort. Sci.* 65: 309-321, 1990.
23. WHO. Seventeenth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Food Additives series*, 5: 92-96, 1974.
24. WHO. Twentieth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Food Additives series*, 10: 86-99, 1976.

Recebido para publicação: 12.09.94.