



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

# REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855

RIALA 6

VOLUME 56

NÚMERO 1

1996

**DIRETOR RESPONSÁVEL**

LUIZ CARLOS MENEGUETTI

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz - 1995 / 1996

**COMISSÃO DE REDAÇÃO**

JOSÉ EDUARDO TOLEZANO, Presidente

PAULO TIGLEA

JÚLIA MARIA MARTINS DE SOUZA FELIPPE

DILMA SCALLA GELLI

HEIDI PINTO MARTINS

ALICE MOMOYO ATA SAKUMA

MYRNA SABINO

CELUTA HELENA MACHADO PAGANELLI, Secretaria da Comissão

---

PRODUÇÃO:

**EDITORA LETRAS & LETRAS**

EDITOR

*Carlos José Linardi*

Av. Ceci, 1945 – S. Paulo – SP

CEP 04065-003

Fone/Fax (011) 577-5746

---

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 - 1996, 1-56

1996,56 (1)

ISSN 0073-9855

RIALA6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

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

## 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 outubro de 1988, do Conselho Nacional de Metrologia. Normalização e Qualidade Industrial. Diário Oficial, Brasília, 21 out. 1988. Seção I, pt. 1, p. 20524-32. Aprova a Regulamentação Metrológica que com esta baixa revoga a Resolução nº 01/82, de 27 de abril de 1982).

**TABELAS** - Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que deverão indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não deverão ser repetidos em gráficos, 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 e desenhos deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal, com letras e números escritos com normógrafos.

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

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

DESCRITORES - Palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do artigo. Os três principais descritores serão escritos em primeiro lugar, por ordem de importância. Recomendam-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... TAUNAY<sup>11</sup> verificou...; para dois autores... LEME & CARRIJO<sup>19</sup>, pesquisando...; para mais de dois autores: no trabalho de TSUNODA)A et alii<sup>6</sup>; ou ainda... seguindo vários autores<sup>1,3,7,8</sup>.

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 da 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 Adolfo 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 no original. Esse 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 aprovação, 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 30 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 de conformidade com a legislação sobre Direitos Autorais.

## DA DISTRIBUIÇÃO

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

## SUMÁRIO/CONTENTS

## MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA MÉDICA / MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

## Artigo

## ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 790 Avaliação das atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos T humanos nas frações parcialmente purificadas da lectina de massa de ovas de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina).  
Evaluation of hemagglutination activity and linfocyte T interaction in the fraction partially purified from spawn lectin of *Biomphalaria glabrata*. ..... 1-12
- 791 Contribuição da Imunoelectroforese cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ou soro no diagnóstico de infecções *Neisseria meningitidis* grupo B no Brasil.  
Contribution of counterimmunoelectrophoresis in cerebrospinal fluid and/or serum in the diagnosis of *Neisseria meningitidis* group B infections in Brazil. .... 13-17
- 792 Rabies virus in McCoy cell line. -Part III (Purification).  
Vírus Rábico em célula McCoy - Parte III (Purificação).  
NOGUEIRA, Y. L. & SOUZA-FELIPE, J. M. M. .... 19-26

## PATOLOGIA CLÍNICA / CLINICAL PATHOLOGY

## ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

- 794 Fenilcetonúria  
Phenylketonuria  
MARTINS, H.P. .... 47-52

## AGENTES E DOENÇAS EMERGENTES / EMERGENT AGENTS AND DISEASES

## ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

- 793 Dengue  
Dengue - BARBOSA, M.L. .... 27-45

## HIGIENE DE ALIMENTOS / FOOD HYGIENE

## ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 799 Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas - SP - no período de 1987 a 1993. - Predomínio da ocorrência de surtos em serviços de alimentação e agentes envolvidos.  
Evaluation of foodborne disease outbreaks proved by laboratory test in the city of Campinas - SP - between 1987 and 1993. - Predominance of outbreaks in food service establishments and etiologic agents involved. PASSOS, M. H. C. R. & KUAYE, A. Y. .... 77-82

- Relato de surto de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*. Importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença.  
Food - poisoning due to cake contaminated by *Staphylococcus aureus*. Importance of the hygiene of foodhandlers and holding conditions for the disease prevention.  
PASSOS, M.H.C.R. & KUAYE, A.Y. .... 71-76

- 800 Comparação entre caldos de enriquecimento tryptic soy com 10% de cloreto de sódio e Giolitti-Cantoni usados na determinação de estafilococos coagulase positiva em alimentos.  
Comparison of tryptic soy broth with 10% salt and Giolitti-Cantoni broth used in determination of coagulase positive staphylococci in foods. PERESI, J.T.M.; KAKU, M.; GELLI, D.S.; LIMA, S.I. & DUARTE, V.L.S. .... 83-86

## CONTAMINANTES QUÍMICOS / CHEMICAL CONTAMINANTS

### ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 801 Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub>.  
Comparative study of methods to aflatoxin M<sub>1</sub> determination.  
SYLOS, C.M. & AMAYA, D.R. .... 87-97

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AUTENTICIDADE DE ALIMENTOS / CHEMICAL COMPOSITION AND FOOD AUTHENTICITY

### ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 804 Avaliação da qualidade do café torrado e moído e torrado processado na região de Campinas, Estado de São Paulo.  
A quality evaluation of the toasted powder-coffee processed in Campinas region, São Paulo, Brazil. PEDRO, N.A.R.; BADOLATO, M.I.C.; FREITAS, V.P.S. & CHIARINI, P.F.T. .... 113-117
- 803 Estudo das características físicas e químicas de coco ralado comercializado a varejo e de coco *in natura* com relação aos parâmetros legais vigentes.  
Evaluation of physicochemical characteristics of desiccated coconut in relation to Brazilian current legislation. TAVARES, M.; AMARAL-MELLO, M.R.P.; MINAZZI-RODRIGUES, R.S.M. & CAMPOS, N.C. .... 105-112
- 795 Alteração na qualidade da água de abastecimento por filtros domésticos.  
Changes in drinking water quality submitted to household filters. NISHIHARA, L. & ALABURDA, J. .... 53-57
- 797 Teor de iodo e classificação granulométrica do sal consumido na área biocégena de Goiás.  
Iodine content in salt in the goitrous area in Goiás and granulometric classification of samples. SILVEIRA, N.V.V.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H.; SOUZA, A. & RIBEIRO, A. .... 65-70
- 802 Diagnóstico microscópico de farinha múltipla constituída de folhas de *Manihot utilissima* Pohl (mandioca), *Cucubita pepo* L. (abóbora), *Secchium edule* Swartz (chuchu), *Ipomoea batatas* Lam. (batata-doce), *Vitis* sp. (uva) e *Hibiscus esculentus* L. (quiabo).  
Microscopic diagnosis of the multiple flour constituted of leaves of *Manihot utilissima* Pohl (cassava), *Cucurbita pepo* L. (pumpkin), *Secchium edule* Swartz (chayote), *Ipomoea batatas* Lam. (sweet potato), *Vitis* sp. (grape) and *Hibiscus esculentus* L. (okra). JORGE, L.L.F.; SILVA, I.C.A.LEE, L.M. & NOGUEIRA, M.D. 99-104
- 796 Determinação de teobromina e cafeína em cacau e produtos de chocolate por cromatografia líquida de alta eficiência.  
High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. YABIKU, H.Y. & KIMURA, I.A. .... 59-64

## AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES HEMAGLUTINANTES E DE INTERAÇÃO COM LINFÓCITOS T HUMANOS NAS FRAÇÕES PARCIALMENTE PURIFICADAS DA LECTINA DE MASSAS DE OVAS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (VARIEDADE ALBINA).

\* Shirley Rosa UTIYAMA  
\*\* Maria Eugenia R. DUARTE  
\*\* José Hazencleve DUARTE  
\*\*\* Paulo Roberto WUNDER

RIALA6/790

UTIYAMA, S.R. et alii - Avaliação das atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos T humanos nas frações parcialmente purificadas da lectina de massas de ovas de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):1-12, 1996.

RESUMO: O extrato bruto de massas de ovas (MO) de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina), após precipitação fracionada com sulfato de amônia, forneceu uma fração protéica de 30-70% de saturação, que além da atividade lectínica hemaglutinante, também foi capaz de interagir com linfócitos T humanos. Tal fração foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE Sephadex A-50-120, e três frações com atividades biológicas distintas foram obtidas: F-I) fração hemaglutinante; F-III) fração de interação com linfócitos, e FIL) contendo as duas atividades. A fração de interação com linfócitos (FIL) se mostrou um potente bloqueador da formação de rosáceas espontâneas entre linfócitos T e eritrócitos de carneiro. Essa inibição não foi afetada por íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  e não foi revertida na presença dos inibidores preferenciais de hemaglutinação (ceto-hexoses) ou de outros açúcares. Além disso, o fenômeno de rosáceas não foi inibido quando os eritrócitos foram previamente incubados com FIL.

Ensaio de imunofluorescência indireta e citometria de fluxo demonstraram que FIL bloqueou a ligação do anticorpo monoclonal anti-CD<sub>2</sub> com o receptor de membrana de linfócitos T, reforçando os dados preliminares obtidos com a inibição de rosáceas.

DESCRIPTORIOS: Lectina, Moluscos, Linfócitos, *Biomphalaria glabrata*.

### INTRODUÇÃO

As lectinas são macromoléculas de natureza protéica, de origem não imune e que se ligam não covalentemente a carboidratos com configuração apropriada<sup>2,8</sup>. Dessa interação resultam propriedades químicas e biológicas diversas tais como, hemaglutinação, efeito mitogênico, aglutinação de células tumorais, entre outras, que têm conferido às lectinas uma aplicabilidade crescente, tanto na identificação de marcadores de superfície celular quanto na purificação de oligossacarídeos e glicoconjugados de membrana<sup>11,12,20,21</sup>.

Embora as lectinas de plantas sejam as mais estudadas, elas não são privativas desse gênero. Nos gastrópodos, por exemplo, as lectinas são encontradas principalmente na hemolinfa, glândula de albumen e nas massas de ovas<sup>5,16,19</sup>. Os moluscos do gênero *Biomphalaria*, da família *Planorbidae*, hospedeiros intermediários do trematoda *Schistosoma mansoni*, foram estudados pela primeira vez em 1973, por SAMPAIO et alii<sup>19</sup>. Esses autores caracterizaram na glândula de albumen de *B. glabrata* e *B. straminea* a presença de uma lectina com propriedade hemaglutinante para eritrócitos humanos dos grupos A e B.

\* Departamento de Patologia Médica - Laboratório de Imunopatologia - UFPr

\*\* Departamento de Bioquímica - UFPr

\*\*\* Departamento de Patologia Médica - Disciplina de Imunologia Clínica - UFPr

Posteriormente, STANISLAWSKI et alii, MICHELSON & DUBOIS<sup>16</sup> e BRETTING et alii<sup>3</sup>, também demonstraram a propriedade hemaglutinante dessa lectina, empregando diferentes métodos de purificação por cromatografia.

Ensaio preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que além da propriedade hemaglutinante anteriormente caracterizada, uma fração protéica da massa de ovas (M.O.) de *B. glabrata* (variedade albina) apresentava atividade de interação com linfócitos T humanos<sup>23</sup>. Tal atividade não foi revertida em presença de diferentes açúcares testados, impossibilitando, por enquanto, denominar-se esta fração de lectina, que passa a ser designada como fração de interação com linfócitos (FIL).

Como não foi encontrada na literatura nenhuma investigação relativa à interação de proteínas de M.O. de *B. glabrata* com linfócitos T humanos, o presente trabalho tem por objetivo um estudo mais detalhado das atividades biológicas destas proteínas, bem como procura separar e preservar as atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos pelo uso de cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção das massas de ovas*

Os moluscos do gênero *B. glabrata* (variedade albina) foram cedidos pela Universidade Estadual de Londrina-Pr. Os mesmos foram mantidos em aquários apropriados com água aerada e iluminação constante. As massas de ovas (M.O.) foram coletadas diariamente da superfície de placas de isopor e conservadas em solução de NaCl 0,9% em freezer a -20°C.

### *Purificação da lectina*

O processo de extração das lectinas de M.O. dos moluscos *B. glabrata* foi realizado por trituração das M.O. em aparelho de Von Potter Elvehjem, à temperatura de 0-4°C, utilizando NaCl 0,9% (Merck) como extrator. Após centrifugação a 10.000xg, por 20 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Sorvall Inc. RC2-B), o resíduo foi reextraído e o sobrenadante de cada extração reunido e considerado como sendo o extrato bruto (E.B.). Após a precipitação fracionada com sulfato de amônia, nas saturações de 0-30%, 30-70% e 70-90%, os precipitados foram solubilizados em NaCl 0,9% e exaustivamente dializados contra esta mesma solução, até apresentarem teste negativo com reagente de Nessler. A fração obtida da saturação de 30-70% com sulfato de amônia foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120 (Sigma), previamente tratada com solução de NaCl 0,9% que também serviu como eluente. O fluxo de escoamento foi de 20ml/hora (coletor LKB-7000

Ultrarac). As frações eluídas foram avaliadas quanto ao teor de proteínas, açúcar, atividade hemaglutinante e interação com linfócitos.

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de LOWRY et alii<sup>13</sup>, enquanto as de carboidratos foram determinadas pelo método fenol ácido sulfúrico, conforme descrito por DUBOIS et alii<sup>6</sup>.

### *Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos humanos*

A atividade hemaglutinante foi avaliada em cada etapa do processo de purificação. A 100µl de cada fração, adicionava-se 100µl de solução de NaCl 0,9% e 20µl de suspensão de eritrócitos humanos a 2% (grupos A,B, AB e O separadamente). As leituras foram realizadas 6-12 horas após o início da reação.

O efeito de cátions divalentes (Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>) e da atividade inibidora de açúcares foi testado de forma similar, substituindo-se, nos sistemas, a solução de NaCl 0,9% por solução, contendo os cátions (10mM), ou açúcares inibidores (100µmoles/ml) respectivamente.

### *Separação de linfócitos do sangue periférico*

Sangue de doadores sadios foi coletado em presença de heparina livre de preservativos (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram obtidas por centrifugação a 200xg por 30 minutos em gradiente de Ficoll Hypaque (Histopaque-1077, Sigma). As células foram lavadas duas vezes em NaCl 0,9% e uma vez em meio RPMI-1640 (Sigma). A concentração celular adequada para cada protocolo foi ajustada em meio RPMI-1640 suplementado com 2mM de glutamina (Sigma), 22mM de Hepes (Sigma), 30µg/ml de ampicilina (Cibran) e 2,0g/l de bicarbonato de sódio (Merck), doravante denominado de meio completo.

### *Efeito da proteína de M.O. de B.glabrata sobre a formação de rosáceas espontâneas entre linfócitos T e eritrócitos de carneiro (E)*

Linfócitos humanos na concentração de 6 x 10<sup>6</sup> células/ml de meio completo, num volume de 100µl, foram misturados com 100µl de cada fração obtida das M.O. de *B.glabrata* e 100µl de meio completo. O sistema foi incubado a 25°C durante 5 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán (Merck), a qual sempre se mostrou superior a 95%. Na seqüência, 100µl dessa solução foram colocados em presença de 100µl de E a 0,5%.

A mistura foi submetida à centrifugação a 150xg por 5 minutos à temperatura ambiente e incubada por 60 minutos a 4°C em banho de gelo. Após incubação, o sedimento de células foi ressuspenso delicadamente e a contagem de linfócitos foi efetuada em câmara de Neubauer. O resultado foi expresso na forma de média das porcentagens de células formadoras de rosáceas E, obtidas a partir das contagens de experi-

mentos em duplicatas feitas em microscópio ótico comum (Olympus CBA).

Linfócitos não tratados com as frações protéicas de M.O. de *B.glabrata* foram utilizados como controles normais da formação de rosáceas E.

Com a finalidade de se determinar a temperatura ideal de reação entre a FIL e os linfócitos, foram realizados experimentos semelhantes de rosáceas-E, nos quais se estabeleceu uma curva com as seguintes temperaturas de incubação: 4°, 15°, 25°, 30° e 37°C.

Com relação ao tempo necessário para a interação da proteína de M.O. de *B.glabrata* (FIL) com linfócitos, foram preparados experimentos em que o sistema foi incubado por 1, 3, 5, 7, 16 e 24 horas, respectivamente, prosseguindo-se conforme descrito anteriormente.

Nos ensaios com açúcares inibidores, procedeu-se conforme o protocolo inicial, substituindo-se os 100µl de meio completo por 100µl da solução de açúcar (10 µmoles). Os seguintes açúcares foram utilizados: D-frutose, D-galactose, D-mannose, L-fucose, L-sorbose, L-rhamnose, α-metil-D-glucosídeo, β-metil-D-galactosídeo, myo inositol, metil frutofuranosídeo, ácido N-acetil neuramínico, ácido láctico, e N-acetil-D-glucosamina.

#### *Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)*

Células mononucleares na concentração de  $5 \times 10^5$  células/100µl de meio completo foram pré-incubadas com 100µl de FIL por 5 horas a 25°C. A seguir, as células foram lavadas em meio completo e incubadas com 25µl de anticorpo monoclonal anti-CD2 (Becton Dickinson) por 30 minutos a 4°C. Após nova lavagem, as células foram incubadas com 100µl de soro de cabra anticamundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Sigma, USA), por 30 minutos a 4°C. Após duas lavagens, as células foram res-suspensas e examinadas em microscópio de fluorescência (Epi-iluminação, lâmpada de halogênio, Carl Zeiss, Germany). Trezentas células foram contadas e a porcentagem de células fluorescentes foi determinada. Como controle foram utilizadas células não tratadas com FIL, e incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD2.

#### *Citometria de Fluxo*

Os testes de imonofluorescência foram repetidos em um aparelho FacScan (Becton-Dickinson, USA). A fluorescência produzida pelo FITC foi excitada por meios de luz de argônio a 488nm. Os dados foram coletados em um computador Hewlett Packard 9153C

acoplado ao FacScan. Somente as células separadas na janela para linfócitos foram analisadas, e 10.000 células medidas em cada análise.

O aparelho foi calibrado por meio de partículas de látex conjugadas ao FITC (pérolas calibradas de 4:8µm-Becton Dickinson, USA). A preparação de linfócitos na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml foi incubada com diferentes concentrações de FIL (tubos 2,3 e 4) por 5 horas a 25°C. Após uma lavagem as células foram incubadas com 200µl do anticorpo monoclonal anti-CD2 (tubos 2,3 e 4). Em paralelo, uma parte das células, sem a FIL, foi incubada com o controle isotípico (tubo 5) marcado com fluoresceína (4°C, 30 minutos). Após duas lavagens, as células foram ressuspensas em meio completo e analisadas no FacScan. No controle negativo, os linfócitos não receberam o anticorpo-CD2, nem o controle isotípico. O controle positivo foi obtido pela incubação de linfócitos com anticorpo anti-CD2 (tubo 1).

## RESULTADOS

### *Purificação parcial da lectina de M.O. de B.glabrata*

A Tabela 1 mostra as etapas de purificação da lectina de *B.glabrata* com sulfato de amônia.

Após a precipitação fracionada com sulfato de amônia, a fração 30-70% permitiu recuperar 25% das proteínas em relação ao E.B., apresentando uma relação proteína total/açúcar total de 3,15. Esta fração, por apresentar melhor atividade de interação com linfócitos, foi selecionada para purificação em coluna de DEAE-Sephadex e tal tratamento possibilitou recuperar 3,4% de proteínas nas frações I, II e III. As demais frações (F-70-90% e F-90-100%) apresentavam menor atividade para hemáceas e linfócitos, e por isso não foram investigadas.

### *Separação das atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos*

A cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120 da fração de saturação 30-70% com sulfato de amônia permitiu separar e preservar as atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos (FIL). Os resultados relativos à concentração de proteína e açúcar total das frações recuperadas da coluna de DEAE-Sephadex, bem como a atividade biológica da lectina estão representadas na Figura I.

Foram obtidas três frações com as seguintes atividades: F-I) ativa apenas para hemácias do sistema ABO humano; F-III) ativa apenas para linfócitos humanos (FIL); F-II) com atividade para ambas as células.

TABELA 1

PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE M. O. DE *B. GLABRATA* (VAR. ALBINA). FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIA E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA FRAÇÃO 30-70%\* EM COLUNA DE DEAE-SEPHADEX A-50-120.

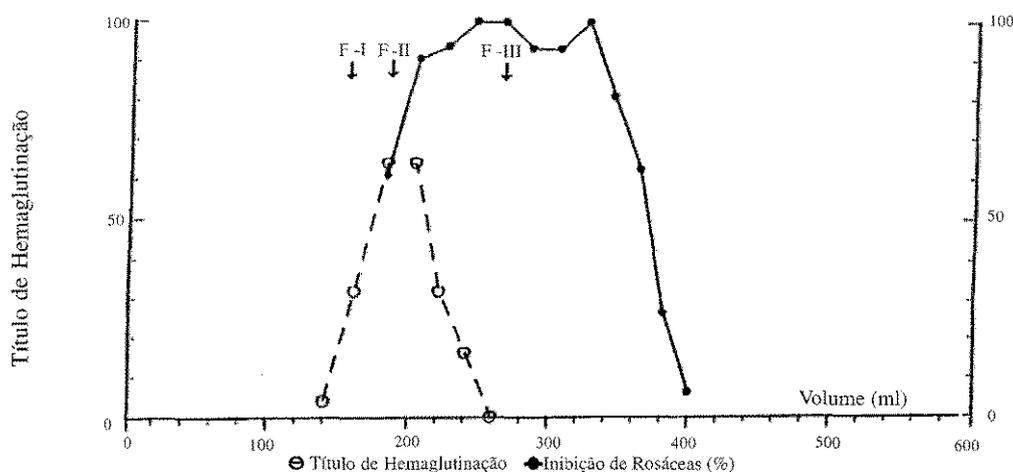
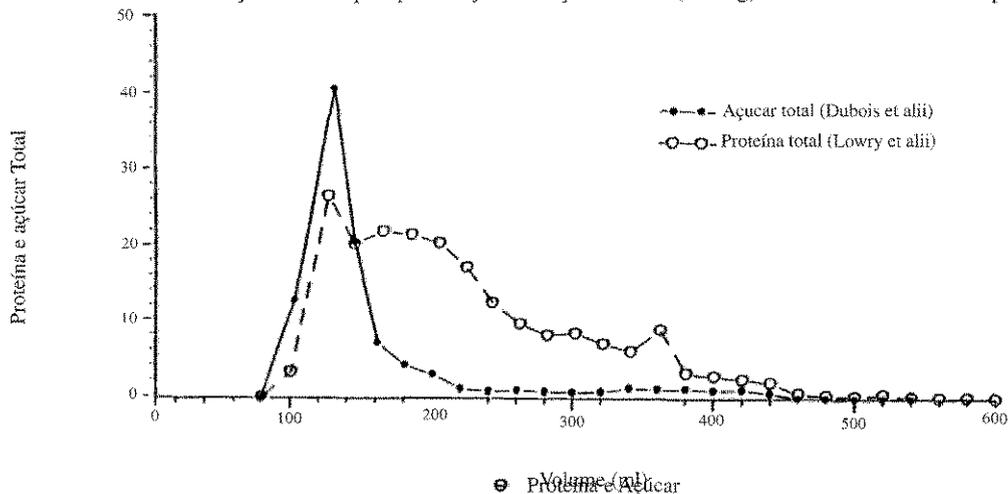
FRAÇÕES	VOL. (ml)	PROT. TOTAL (mg)	AÇÚCAR TOTAL (mg)	PROT. TOTAL AÇÚCAR TOTAL	RENDIMENTO <sup>a</sup> (%)	PROTEÍNA <sup>b</sup> µg
EB	650	5044	11739	0,43	100	33,9
F-30-70%	135	1250	397	3,15	25	77,0
F-70-90%	108	850	495	1,72	17	131,0
F-90-100%	50	467	282	1,66	9	155,0
*F-I	40	42,7	28,07	1,52	0,84	-
*F-II	60	59,9	8,44	7,09	1,19	-
*F-III	220	67,1	11,03	6,08	1,33	6,3

<sup>a</sup> - Rendimento em relação ao extrato bruto (EB).

<sup>b</sup> - Concentração mínima de proteína com atividade inibitória para rosáceas-E.

\* - Fração 30-70% contendo 202mg de proteína total (Lowry et alii).

\* - F-I, F-II e F-III = Frações obtidas pela purificação da fração 30-70% (202mg) em coluna de DEAE - Sephadex.



F-I) Fração ativa para hemácias (eluída entre 140 e 180 ml)

F-II) Fração com atividade mista (eluída entre 180 e 260 ml)

F-III) Fração ativa com linfócitos (eluída entre 260 e 440 ml)

\* Coluna utilizada: 40/3,5cm; eluente: NaCl 0,9%; fluxo de escoamento: 20 ml/hora.

Fração aplicada: F-30-70% (12,5 ml - 202,4 mg de proteínas)

*Propriedade hamaglutinante da lectina de B. glabrata*

Os ensaios de hemaglutinação permitiram reafirmar para o molusco de *B. glabrata* (variedade albina), a ausência de atividade com hemácias humanas do grupo "O" e atividade acentuada com hemácias dos grupos "A" e "AB" (Figura II). A adição de cátions divalentes Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> duplica a atividade hemaglutinante máxima sobre hemácias humanas dos grupos A, B, e AB. Após a purificação em DEAE-Sephadex, foi possível observar atividade hema-

glutinante até a concentração mínima de 1,61µg de proteína/100µl, o que representou uma purificação para F-I de 3,6 vezes em relação à F-30-70%, que apresentava atividade até a concentração mínima de 5,75µg/100µl (dados não demonstrados).

Investigando-se o efeito de açúcares inibidores sobre a reação de hemaglutinação, verificou-se serem as cetohexoses, D-frutose, D-mannose, e L-fucose os inibidores preferenciais da reação (2,5 a 10µmoles), conforme observa-se na Tabela 2.

TABELA 2

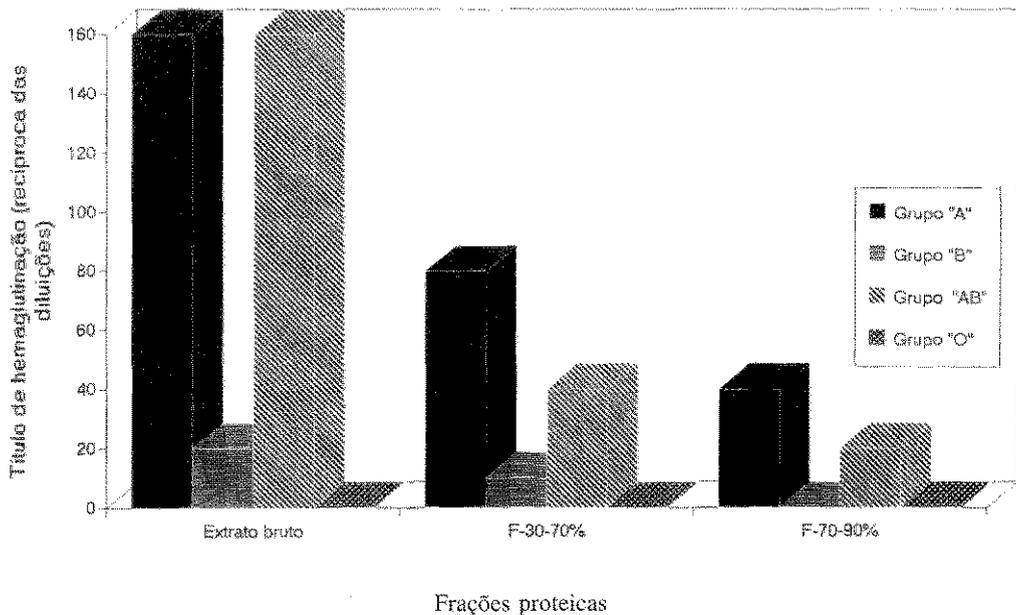
Açúcares inibidores da reação de hemaglutinação da lectina de M.O. de *B. Glabrata* (Var. Albina).

INIBIDORES	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (µmoles)		
	GRUPO "A"	GRUPO "B"	GRUPO "AB"
D-frutose	2,5	2,5	2,5
D-mannose	6,6	2,5	2,5
Metil fruto-furanosídeo	5,0	5,0	5,0
L-sorbose	13,3	13,3	13,3
Myo inositol	16,6	13,3	13,3
N-acetil-D-glucosamina	10,0	10,0	10,0
L-fucose	8,3	6,6	6,6

Os valores obtidos representam a média de 3 experimentos para cada grupo sanguíneo.

FIGURA II

Reação de hemaglutinação da lectina de M.O. de *B. glabrata* com eritrócitos do sistema ABO humano



Os títulos obtidos representam a média de 3 experimentos com sangues diferentes para cada grupo sanguíneo. \* F-30-70% e F-70-90% = frações semipurificadas com sulfato de amônia.

*Efeito da FIL sobre a formação de rosáceas -E(RE)*

Na Tabela 3 estão demonstrados os resultados de 10 experimentos de formação de RE. Os controles normais apresentaram uma média de 59,7% de células formadoras de RE, enquanto nos ensaios realizados em presença de FIL, a média foi de 1,7%, representando 97,1% de inibição de formação de RE. Nos sistemas em que as células foram lavadas duas vezes com meio completo, previamente à adição de eritrócitos de carneiro, os valores de inibição de RE (99%) foram tão

elevados quanto aqueles com células não lavadas (97,1%). Em cada etapa da purificação da FIL foram realizadas titulações com a finalidade de se detectar a diluição máxima de proteína capaz de inibir a formação de RE (Figura III e Tabela 1). Observou-se que a fração de interação com linfócitos, na concentração mínima de 6,3µg de proteína (diluição 1:64) ainda produzia um alto índice de inibição de RE, o que representava uma purificação de 5,38 vezes em relação ao E.B. que necessitava de uma concentração mínima de 33,9µg de proteínas (diluição 1:4) para produzir inibição de RE.

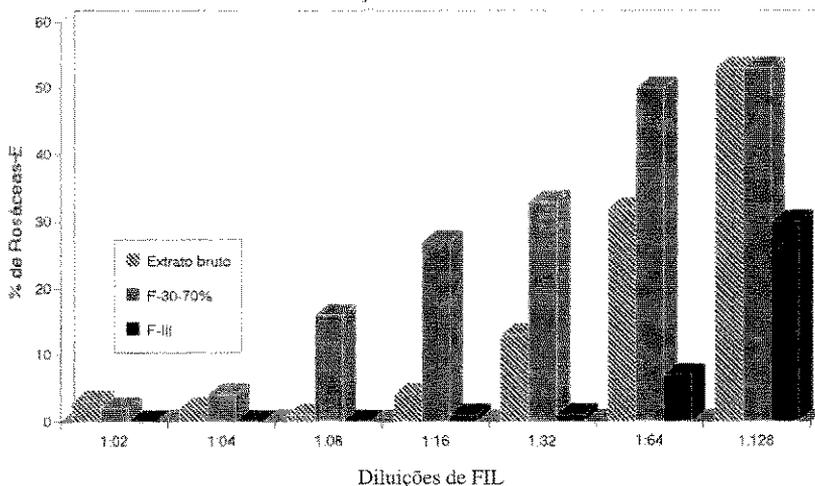
TABELA 3  
Efeito da proteína de M.O. de *B. glabrata* sobre a formação de Rosáceas-E

EXPERIMENTO	% DE ROSÁCEAS - E (5h, 25°C)			
	CONTROLE	LINF. + E.B. (SEM LAVAR)	LINF. + E.B. (LAVADO)	VIABILIDADE CELULAR
1	50	0 (100)	0 (100)	98
2	59	0 (100)	0 (100)	100
3	61	2 (97)	ND	97
4	61	0 (100)	0 (100)	99
5	61	3 (95)	2 (97)	97
6	64	0 (100)	ND	100
7	60	3 (95)	1 (98)	98
8	56	4 (93)	ND	98
9	59	2 (96)	ND	96
10	66	2 (95)	ND	95
$\bar{X}$	59,7 ± 4,14	1,7 (97,1) ± 1,48	0,6 (99) ± 0,89	97,8 ± 1,53

$\bar{X}$  - Representa a média de 10 experimentos com sangues de diferentes doadores.  
Os valores entre parênteses representam % de inibição de formação de Rosáceas-E.  
E.B. - Extrato bruto de M.O. de *B. glabrata*.  
ND - Não determinado.

FIGURA III

Caracterização da diluição máxima da proteína de M.O. de *B. glabrata* com efeito inibitório sobre a formação de rosáceas-E



Concentração mínima de FIL com atividade inibitória para rosáceas-E: EB=33,9 µg de prot.(dil. 1:16); F-30%=77µg de prot.(dil. 1:4); F-III=6,3µg de prot.(dil. 1:64). \*Controle sem FIL=60% de rosáceas-E.

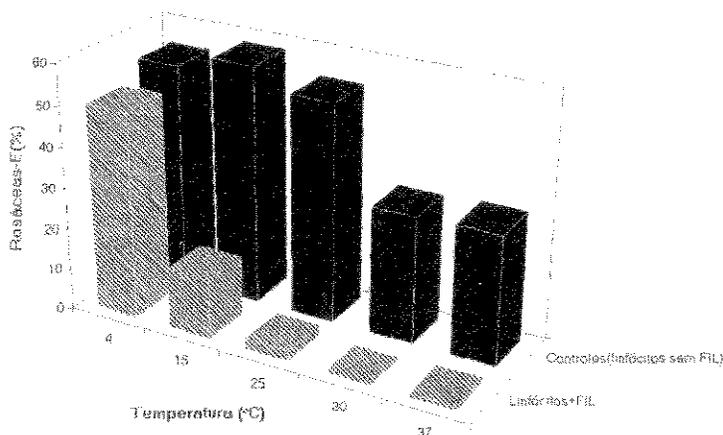
Experimentos paralelos demonstraram que FIL não se liga aos eritrócitos de carneiro, quando previamente incubada com estes, uma vez que a porcentagem de células formadoras de rosáceas foi semelhante àquela observada nos controles sem a proteína.

*Efeito da temperatura sobre a inibição de RE*

A figura IV demonstra que a temperatura ideal para que a FIL iniba a formação de RE é de 25°C. Nessa temperatura foi possível obter uma média de 2,6% de

FIGURA IV

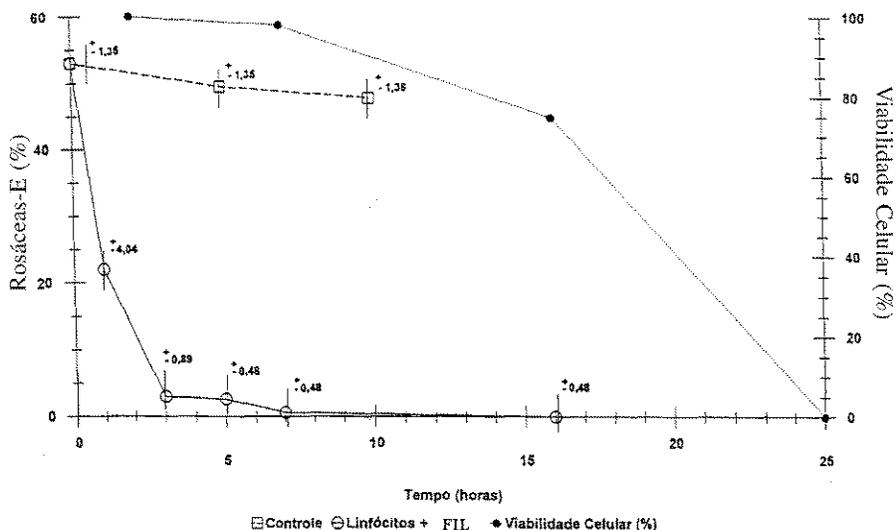
Efeito da temperatura de incubação sobre a interação de proteína de M.O. de *B. glabrata* (FIL) e linfócitos humanos.



Todos os valores representam a média de 5 experimentos com sangues diferentes. \*Tempo de incubação entre linfócitos e FIL = 5 horas.

FIGURA V

Efeito do tempo de incubação sobre a interação de proteína de M.O. de *B. glabrata* (FIL) e linfócitos humanos.



Todos os valores representam a média de 5 experimentos com sangues diferentes. Temperatura de incubação = 25°C.

RE após incubação dos linfócitos com a proteína por 5 horas, o que representou 95,1% de inibição na formação de RE, sem no entanto se verificar alteração importante nos controles sem a FIL.

Em temperaturas mais elevadas (30 e 37°C), embora a porcentagem de inibição de formação de RE seja maior (100 e 97,4% respectivamente), os controles forneceram resultados discrepantes.

*Efeito do tempo de incubação sobre a capacidade de inibidora de RE da FIL de B. GLABRATA*

A influência do tempo de incubação sobre a interação da FIL com linfócitos humanos pode ser verificada na Figura V. Esses resultados demonstram que entre 3 e 7 horas de incubação, tem-se os melhores percentuais de inibição de RE (3% e 0,6% de RE;

Tabela 4

Efeito de açúcares na interação entre proteínas de M.O. de *B. glabrata* (FIL) e linfócitos T humanos

Inibidores (10 µmoles)	% de Rosáceas-E (5h, 25°C)		Viabilidade Celular (%)
Metil frutofuranosídeo	4	(7)	100
D-frutose	1	(1,7)	98
D-galactose	0	(0)	98
D-mannose	0	(0)	98
L-sorbose	0	(0)	99
Myo inositol	4	(7)	99
B-metil D-galactosídeo	2	(3,5)	98
L-rhamnose	0	(0)	96
N-acetil D-glucosamina	4	(7)	97
D-glucosamina	4	(7)	97
a-metil D-glucosídeo	1	(1,7)	97
Glicuronato de sódio	1	(1,7)	90
Ác. N-acetil neuramínico	3	(5)	96
L-fucose	3	(5)	95
Ác. láctico	3	(5)	95

Os valores entre parênteses representam a % de inibição da atividade da proteína. Controle da reação sem FIL = 57% de Rosáceas-E. Controle com FIL (sem açúcar) = 0% de Rosáceas-E.

Tabela 5

Incubação prévia dos linfócitos humanos com a proteína de M.O. de *B. glabrata*: inibição da reação com anticorpo monoclonal

Experimento	% de Rosáceas-E		% de Linfócitos Fluorescentes	
	Controle (sem FIL)	Linfócitos + FIL	Linfócitos + Ác. Monocl.	Linfócitos + FIL + Ác. Monocl.
1	50	3 (94) <sup>a</sup>	56	6 (89) <sup>b</sup>
2	57	2 (96)	49	7 (86)
3	54	3 (94)	52	7 (86)
X	53,6 ±2,86	2,6 (95) ±0,47	52,3 ±2,86	6,6 (87) ±0,47

<sup>a</sup> - Os valores entre parênteses representam a % de inibição de formação de Rosáceas - E.

<sup>b</sup> - Os valores entre parênteses representam a % de inibição da ligação do anticorpo monoclonal.

controle: 53% e 49% de RE, respectivamente). Assim sendo, o tempo de 5 horas foi escolhido como sendo o ideal, tanto no aspecto de inibição de RE (2,6% RE), quanto para a viabilidade celular (98%), que se mostrou prejudicada somente após 16 horas de incubação.

#### *Efeito dos açúcares inibidores na interação proteína-linfócito*

As atividades biológicas das lectinas normalmente são revertidas pelo uso de inibidores específicos.

Na Tabela 4 estão representados os experimentos que demonstram os ensaios com açúcares inibidores. Verificou-se que nem mesmo aqueles açúcares que se mostraram fortes inibidores da atividade hemaglutinante (D-frutose, D-mannose, L-fucose) exerceram efeito na interação da proteína de M.O. de *B. glabrata* com linfócitos. A presença dos açúcares não alterou a viabilidade celular.

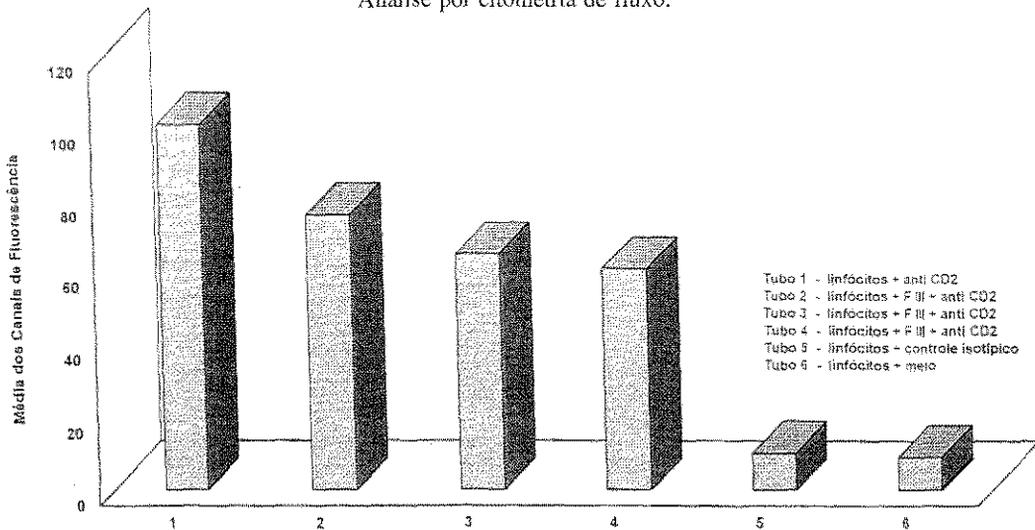
#### *Possível interação da FIL com o receptor CD2 de membrana de linfócitos T humanos*

Na tentativa de esclarecer se a inibição de RE pela FIL era devido à interação com o receptor CD2 na membrana de linfócitos T, foram realizados ensaios utilizando anticorpo monoclonal anti-CD2 marcado com isotiocianato de fluoresceína.

Os resultados da Tabela 5 mostram inicialmente um grupo de 3 experimentos de rosáceas, onde se observa que 56,6% dos linfócitos formaram RE, enquanto que linfócitos previamente incubados com a FIL não foram capazes de formar rosáceas (média=2,6%), demonstrando forte inibição de 95% causada pela presença da FIL. Experimentos em paralelo com anticorpo anti-CD2 fluorescente, mostraram que após incubação de linfócitos com anti-CD2, 52,3% das células apresentaram fluorescência. Por outro lado, quando os linfócitos foram previamente incubados com FIL, apenas 6,6% eram fluorescentes, demonstrando intensa inibição de fluorescência devido à presença de fração protéica. Com a finalidade de analisar melhor esses resultados foram realizados experimentos adicionais em citometria de fluxo, onde se observou que a proteína de M.O. de *B. glabrata* (FIL) foi capaz de inibir parcialmente a interação do anticorpo monoclonal anti-CD2 com o receptor de membrana de linfócitos T (tubos 2 a 4), em comparação com os grupos controles (tubos 1, 5 e 6). Entretanto, a intensidade da inibição neste grupo de experimentos, não foi igual àquela observada pelo método de imunofluorescência em microscópio com epifluorescência. Pela citometria de fluxo, o nível máximo de inibição da interação do anticorpo monoclonal anti-CD2 com o receptor de membrana de linfócito T foi de aproximadamente 40% (tubo 4).

FIGURA VI

Inibição parcial da ligação do anticorpo monoclonal anti-CD2 à linfócitos T humanos previamente incubados com proteína de M.O. de *B. glabrata*.  
Análise por citometria de fluxo.



Linfócitos incubados 5hs com F-III à temperatura ambiente. Após lavagem as células foram ressuspensas em meio completo ( $1 \times 10^6$ /ml) e colocadas em presença de anticorpo monoclonal anti-CD2. \* Concentrações de F-III: Tubo 2 = 19,6µg de proteína; Tubo 4 = 588µg de proteína.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As lectinas têm sido muito úteis nos estudos envolvendo a modulação da resposta imune celular<sup>14</sup>. Muitos receptores biologicamente importantes da membrana de linfócitos humanos, entre eles a imunoglobulina das células B, os receptores para antígeno de células T, moléculas específicas do Complexo Principal de Histocompatibilidade e o receptor para insulina, foram isolados através de cromatografia de afinidade com lectinas de plantas de especificidades definidas<sup>12,21</sup>.

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que a lectina de *B.glabrata* (variedade albina), embora não apresente-se propriedade leucoaglutinante, possuía atividade de interação com linfócitos T humanos, inibindo formação de rosáceas com eritrócitos de carneiro<sup>22,23</sup>.

Com base nessas considerações, a fração 30-70%, obtida pela semipurificação com sulfato de amônia, por ter sido a que apresentou melhor atividade com hemácias e linfócitos, foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120. Esse processo permitiu a obtenção de três frações protéicas com atividades distintas, sendo uma ativa apenas para hemácias do sistema ABO humano (F-I), outra ativa apenas para linfócitos humanos (F-III), enquanto que F-II mostrou-se ativa para as duas populações (Figura I). A purificação de diversas lectinas de origem vegetal ou animal tem sido realizada por processos semelhantes, utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônia e cromatografia de afinidade<sup>25</sup>. Embora o processo de purificação da proteína de M.O. de *B.glabrata* utilizado neste estudo necessite aprimoramento através da utilização de outros tipos de separação cromatográfica, os dados da Figura I demonstram que a atividade hemaglutinante desta lectina é factível de separação da proteína que apresenta a propriedade de interação com linfócitos (FIL). Este fato evidencia a propriedade do DEAE-Sephadex A-50-120, não apenas de separar as atividades, mas principalmente de preservar as mesmas durante o processo utilizado.

Experimentos de monitoração do processo de purificação realizados através de testes de hemaglutinação, permitiram demonstrar a propriedade hemaglutinante da lectina para hemácias humanas dos grupos, A, B e AB, sendo que a adição de íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  favoreceu tal atividade. Esses dados confirmam resultados anteriores de hemaglutinação<sup>4,18</sup> além de permitirem demonstrar a propriedade hemaglutinante da lectina de *B.glabrata* (variedade albina) para hemácias humanas do sub-grupo A1, previamente tipadas com a lectina de *Dolichos biflorus*. Tal fato não havia sido demonstrado nas investigações anteriormente realizadas.

Em outro grupo de experimentos, avaliou-se o efeito da proteína de M.O. de *B.glabrata* (FIL) sobre a for-

mação de RE. Para isso, foram determinadas as condições ideais relativas ao tempo e à temperatura de incubação. LUBAR et alii<sup>9</sup>, sugerem que os receptores para as lectinas são móveis na superfície celular e que as alterações topográficas são dependentes da temperatura. Por outro lado, tem sido demonstrado que o fenômeno de rosáceas pode ser inibido em temperaturas superiores a 30°C<sup>10,15</sup>. Foi possível observar com 5 horas de incubação a 25° C, que a proteína de M.O. de *B.glabrata* provoca intensa inibição na formação de rosáceas-E (RE=2,5%; controle=53,4%; inibição de RE-95,1%) sem comprometer a viabilidade celular (98%).

Os ensaios com diluições da FIL, tanto no extrato bruto, F-30-70% e F-III pretendiam caracterizar, através da diluição máxima da solução contendo FIL, qual seria a concentração mínima de proteína capaz de inibir a formação de RE. Desta forma, pode-se observar que após a cromatografia em DEAE-Sephadex, F-III atingiu um grau de purificação de 5,38 vezes em relação ao extrato bruto, considerando que F-III na concentração de 6,3µg de proteína ainda produzia um alto índice de inibição de RE, enquanto o extrato bruto necessitava de 33,9µg de proteína para atingir inibição semelhante (Figura III).

As atividades biológicas das lectinas normalmente são reversíveis pelo uso de inibidores específicos<sup>8,11,20</sup>. Ensaios com açúcares inibidores caracterizam as ceto hexoses como inibidores apenas da atividade hemaglutinante (Tabela 2 e 4), não ficando caracterizado nenhum dos açúcares testados como inibidor da FIL. Este fato, aliado aos resultados obtidos no processo de purificação, reforçam a existência de pelo menos duas proteínas distintas. Uma com atividade lectínia hemaglutinante e outra com atividade de interação com linfócitos, que não pode, neste estudo, ser chamada de lectina pela ausência, até o momento, da caracterização de um açúcar inibidor. Vários outros açúcares vêm sendo testados na busca de um inibidor preferencial da atividade com linfócitos.

Com a finalidade de esclarecer o nível de interação entre a FIL isolada de M.O. de *Biomphalaria glabrata* e o linfócito T humano, foram realizados experimentos com anticorpos monoclonais anti-CD2. Esses anticorpos inibem a formação de RE, além de inibirem a citotoxicidade celular mediada por linfócitos T e a resposta proliferativa a antígenos e mitógenos<sup>24</sup>. Baseado nesses dados, o receptor CD2 da membrana de linfócitos T é considerado atualmente como uma molécula sinalizadora e de adesão celular.

Nossos resultados indicam que a FIL bloqueia o sítio de ligação do anticorpo monoclonal anti-CD2, tanto por imunofluorescência indireta quanto por citometria de fluxo, embora por citometria de fluxo, nós tenhamos observado uma intensidade de inibição bem inferior àquela observada por IFI comum.

Isso provavelmente se deve à maior precisão na análise por citometria de fluxo e também ao fato de que o anticorpo monoclonal anti-CD2, por ser bastante específico e dirigido contra uma pequena região da molécula CD2, não seja completamente bloqueado pela proteína, que pode estar ocupando regiões próximas ao sítio de ligação com o anticorpo, deixando espaço para a interação entre ambos, mas impedindo a formação de RE, através da interação entre CD2 e a glicoproteína LFA-3 na membrana do eritrócito. Experimentos adicionais serão necessários para confirmar se a FIL e o anticorpo monoclonal ocupam o mesmo epitopo na molécula CD2 (Figura VI).

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo representam uma contribuição relevante para o estudo de lectinas, ao confirmar originalmente, as atividades biológicas da proteína obtida de M.O. de *B. glabrata* para eritrócitos e para linfócitos T humanos, além de sugerirem a existência de dois componentes distintos, factíveis de separação, sendo um com atividade de lectina e outro com atividade para linfócitos T humanos, possivelmente pela interação com receptor CD2.

Nesse ponto, é interessante comparar as atividades biológicas da proteína de *B. glabrata* com as observa-

ções relatadas com lectinas de diversas origens. De acordo com LIS & SHARON<sup>11</sup>, diversos grupos têm tentado separar as várias atividades de lectinas obtidas de uma mesma fonte animal ou vegetal. O exemplo mais esclarecedor sobre esse particular é o da fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), caracterizada por 5 isolectinas com afinidades distintas para eritrócitos e leucócitos<sup>17,17</sup>.

Esses dados aliados à aplicabilidade crescente de lectinas no campo da imunologia, nos estimulam a desenvolver experimentos de cultura de linfócitos com a finalidade de verificar se a FIL é mitogênica para essas células e, se não for, em que nível de atividade linfocitária ela poderia estar atuando. Em paralelo, protocolos adicionais de purificação e caracterização bioquímica da lectina estão sendo desenvolvidos, além da determinação da especificidade da interação com a molécula CD2, em comparação com experimentos de ligação a outros receptores de membrana de linfócitos T.

#### Agradecimentos

Agradecemos de forma especial à Dra. Zancan, Dra. Noemi Farah Pereira e à Dra. Iara José Tabor da Messias.

RIALA6/790

UTTIYAMA, S. R. et alii - Evaluation of hemagglutination activity and lymphocyte T interaction in the fraction partially purified from spawn lectin of *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):1-12, 1996.

**ABSTRACT:** The extraction and fractional precipitation of proteins from egg masses of the snail *B. glabrata* (var. albin), with ammonium sulfate, produced a 30-70% saturation fraction that was able to interact with human T lymphocytes, besides the original hemagglutinating lectinic activity.

The fraction was submitted to chromatography on DEAE-Sephadex A 50-120 and three further fractions were obtained with distinct biological activities: F-I) hemagglutinating fraction; F-II) lymphocyte interaction fraction and F-III) fraction with both activities. Lymphocyte interaction (LIF) has revealed to be a potent inhibitor of spontaneous E rosette formation with T lymphocytes. Such inhibition was not affected by Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> ions and was not reversed in the presence of preferential inhibitors of hemagglutination (ceto-hexoses) or other sugars. Further more, rosette formation was not inhibited when sheep red blood cells were previously incubated with LIF.

Indirect Immunofluorescence assays and flow cytometry have demonstrated that LIF blocked the binding of the anti-CD2 monoclonal antibody to the lymphocyte membrane receptor, strengthening preliminary data obtained with E rosette inhibition assays.

**DESCRIPTORS:** Lectin, Snail, Lymphocytes, *B. glabrata*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, L.W.; SVENSON, R.H. & YACHNIN, S. - Purification of mitogenis proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: isolation of potent and weak phytohemagglutinin possessing mitogenic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 63:334-41, 1969.
2. BARONDES, S.H. - Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochemi.*, 50:207-31, 1981.
3. BRETTING, H.; STANISLAWSKI, E.; JACOBS, G. & BECKER, W. Isolation and characterization of a lectin from the snail *B. glabrata* and a study of its combining site. *Biochim. Biophys. Acta.*, 749:143-52, 1983.
4. DUARTE, M.E. - Lectinas de massas de ovos de moluscos do gênero *Biomphalaria*. *Dissertação, Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná*, 1980.

5. DUARTE, M.E.; G.R.; DUARTE, H.S.; JACOMINI, M.; FONTANA, J.D. & DUARTE, J.H. - Purificação e caracterização da lectina de massas de ovos de *B. straminea*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 24(1): 151, 1981.
6. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-6, 1956.
7. FELSTED, R.L.; LEAVITT, R.D.; CHEN, C.; BACHUR, N.R. & DALE, R.M.K. - Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 688: 1323-40, 1981.
8. GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. - The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 35:127-340, 1978.
9. INBAR, M.; BEN-BASSAT, H. & SACHS, L. - A specific metabolic activity on the surface membrane in malignant cell transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. - USA*, 68: 2748-51, 1971.
10. LAY, W.A.; MENDES, N.F.; BIANCO, C. & NUSSENZWEIG, V. - Binding of sheep red blood cells to a large populations of human lymphocyte. *Nature*, 230:531-2, 1971.
11. LIS, H. & SHARON, N. - The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.*, 42:541-74, 1973.
12. LIS, H. & SHARON, N. - Lectin as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:35-67, 1986.
13. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARRA, A.L. & RANDAL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
14. MARCHALONIS, J.J. - Lectins in the isolation of receptors on lymphocytes. *Methods in Enzymology*, 150:463-77, 1987.
15. MENDES, N.F.; TOLNAI, M.E.A.; SILVEIRA, N.P.A.; GILBERTSEN, R.B. & METZGAR, R.S. - Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptors and sheep erythrocyte binding (T) lymphocyte. *J. Immunol.*, 111(3):860-7, 1973.
16. MICHELSON, E.H. & DUBOIS, L. - Agglutinin and lysins in the molluscan family *Planorbidae*: a survey of hemolymph, egg-masses and albumen-gland extracts. *Biol. Bull.*, 153:219-27, 1977.
17. MILLER, J.B.; NOYES, C.; HEINRIKSON, R.; KINGDON, H.S. & YACHNIN, S. - Phytohemagglutinin mitogenic proteins. *J. Exp. Med.*, 138:939-51, 1973.
18. SAMPAIO, F.J.C. - Estudo sobre hemaglutininas de glândula de albumen de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*. *Dissertação, Mestrado, Universidade Federal do Paraná*, 1973.
19. SAMPAIO, F.J.C.; DMYTRACZENKO, A. & DUARTE, J.H. - Studies on lectins from the snails *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila*. *Inter. Res. Commun. System.*, 1:2-5, 1973.
20. SHARON, N. & LIS, H. - Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, 177:949-59, 1972.
21. SHARON, N. - Lectin receptor as lymphocyte surface markers. *Adv. in. Immunol.*, 34:213-98, 1983.
22. UTIYAMA, S.R.R.; DUARTE, M.E.R.; DUARTE, G.R.; FONTANA, J.D.; WUNDER, P.R. & DUARTE, J.H. - Biological activity of lectin isolated from egg masses of the snail *B. glabrata* (albin). *Arq. Biol. Tecnol.*, 32 (1): 149, 1989.
23. UTIYAMA, R.R.R. - Interação da lectina de massas de ovos de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina) com linfócitos humanos. *Dissertação, Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná*, 1991.
24. WUNDER, P.R. - Inibidor sérico da resposta linfoproliferativa à interleucina 2. Possível associação com T11 (CD2). *Tese, Doutorado, Escola Paulista de Medicina*, 1987.
25. YATOHGO, T.; NAKATA, M.; TSUMURAYA, Y.; HASHIMOTO, Y. & YAMAMOTO, S. - Purification and properties of a lectin from the fruitbodies of *Flamulina Velutides*. *Agric. Biol. Chem.*, 52(G): 1485-93, 1988.

Recebido para publicação em 11/07/95

CONTRIBUIÇÃO DA IMUNOELETROFORESE CRUZADA EM  
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E/OU SORO NO DIAGNÓSTICO DE  
INFECÇÕES POR *NEISSERIA MENINGITIDIS* GRUPO B NO BRASIL\*

Maria das Graças Adelino ALKMIN\*\*  
Ilka Maria LANDGRAF\*\*  
Maria de Fátima Paiva VIEIRA\*\*

RIALA6/791

ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. - Contribuição da imunoeletroforese cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ou soro no diagnóstico de infecções por *Neisseria meningitidis* grupo B no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):13-17, 1996.

RESUMO: Imunoeletroforese cruzada (IEC) foi empregada para pesquisar a presença de antígeno de *Neisseria meningitidis* grupo B em 185 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou 125 amostras de soro. Dentre as amostras de LCR, 103 (55,7%) foram positivas apenas através da cultura e 36 (19,5%) apenas na reação de IEC. Em 34 (18,4%) destas amostras, ambos os métodos apresentaram resultados positivos. Nos casos em que a cultura foi negativa, a IEC em amostras de LCR e/ou soro contribuiu para o diagnóstico da doença meningocócica grupo B em 26,7% dos casos, sendo que em 99,1% deles já havia sido iniciada terapia antibacteriana. Considerando os resultados positivos obtidos apenas na IEC do soro, foi observada uma percentagem de 5,6%. A contribuição da IEC em LCR e/ou soro foi significativa.

DESCRIPTORIOS: Infecções por *Neisseria meningitidis* grupo B; Imunoeletroforese cruzada; Métodos diagnósticos.

## INTRODUÇÃO

Durante os últimos 20 anos, *Neisseria meningitidis* grupo B tem sido a causa mais comum de doença meningocócica em muitos países<sup>16,18</sup>. Desde 1988, em São Paulo, SP, tem havido um aumento de casos de meningite por *Neisseria meningitidis*, principalmente grupo B. Dados recentes mostraram uma alta incidência de meningococo grupo B em São Paulo: 63% em 1990, 51% em 1991, e 63% em 1992 e 1993<sup>17</sup>.

Diferenças na severidade da doença podem ser atribuídas a variações na virulência dos sorogrupos e também ao desenvolvimento da imunidade natural relacionada à idade. Doença meningocócica fulminante é mais comum em infecções pelos grupos B e C do que pelo grupo A. A proporção de casos em crianças menores de 5 anos é maior com grupo B e menor com grupo A<sup>9</sup>.

Em meningite, um diagnóstico laboratorial precoce é de grande relevância para a indicação de medidas terapêuticas adequadas.

Dentre as técnicas imunológicas usadas para detectar antígeno bacteriano em fluidos corpóreos, como líquido cefalorraquidiano (LCR), soro, urina, a imuno-eletroforese cruzada (IEC) e a aglutinação do látex (LA) têm sido largamente empregadas<sup>2,3,6,11,14</sup>.

A detecção de antígeno de *Neisseria meningitidis* grupo B em fluidos corpóreos, contudo, tem sido dificultada pela ausência de um bom anti-soro grupo específico devido a pouca imunogenicidade deste polisacáride bacteriano<sup>7,9</sup>.

Muitos imunorreagentes para o diagnóstico de doenças infecciosas são produzidos no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP, para suprir os labo-

\* Realizado nas Seções de Imunologia e Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, com financiamento do CNPq (Nº 500782/91-1) e Instituto Adolfo Lutz.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

ratórios de Saúde Pública localizados em diferentes regiões do País.

Com o intuito de melhorar o diagnóstico de meningites bacterianas pela técnica de IEC, anti-soro policlonal anti-*N. meningitidis* grupo B, com alta sensibilidade e especificidade foi produzido no Instituto Adolfo Lutz e tem sido utilizado na rotina desde 1986<sup>1</sup>.

Empregando-se este anti-soro, foi realizado um estudo retrospectivo com a finalidade de avaliar a eficiência do diagnóstico laboratorial de infecções meningocócicas do grupo B através da IEC em amostras de LCR e soro de 1992 a 1994, na Seção de Imunologia, e comparados os resultados com os de cultura.

#### MATERIAL E MÉTODOS

De janeiro de 1992 a dezembro de 1994, amostras de LCR e/ou soro de 185 pacientes com suspeita clínica de meningite e/ou septicemia, sendo 125 amostras de LCR pareadas com amostras de soro, foram examinadas através de cultura de bactérias e IEC. A cultura das amostras de LCR foi processada segundo metodologia já descrita<sup>4</sup>, e a IEC em amostras de LCR e/ou soro foi realizada de acordo com Greenwood et

alii<sup>11</sup>. O anti-soro utilizado neste estudo foi produzido na Seção de Imunologia, segundo método previamente descrito<sup>1</sup>, como também o antígeno polisacarídico usado como controle<sup>10</sup>.

A detecção de agentes antibacterianos no LCR foi realizado de acordo com metodologia já descrita<sup>15</sup>.

#### RESULTADOS

Os resultados do emprego da IEC analisando amostras de LCR e/ou soro e da técnica bacteriológica de cultura de LCR estão descritos na Tabela I.

Foi possível comparar a cultura e a IEC em 185 amostras de LCR. Pode-se observar que em 103(55,7%) das amostras, apenas a cultura foi positiva. Por outro lado, 36(19,5%) destas amostras apresentaram apenas reações positivas na IEC. Em 34 (18,4%) destas amostras de LCR, ambos os métodos mostraram resultados positivos. Computando-se os resultados positivos da cultura e da IEC de LCR, independentemente de terem ocorrido simultaneamente ou não nas mesmas amostras de LCR, a positividade foi de 75,7% (140 amostras) e 38,9% (72 amostras), respectivamente. Considerando os resultados da IEC em amostras de soro, em 15 de um total de 125 casos

TABELA I

Estudo comparativo da técnica de imunoeletroforese cruzada (IEC) em 185 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e 125 amostras de soro, com cultura de LCR de pacientes, no diagnóstico de *N. meningitidis* grupo B (1992-1994).

TÉCNICAS	RESULTADOS POSITIVOS		
	TOTAL (%)	COMANTIBACTERIANO (%)	SEMANTIBACTERIANO (%)
IEC / LCR	36 (19,5)	35 (97,2)	1 (2,8)
IEC / soro	7 (5,6)	7 (100,0)	0 (0,0)
IEC / LCR e IEC / soro	2 (1,6)	2 (100,0)	0 (0,0)
Cultura / LCR	103 (55,7)	0 (0,0)	103 (100,0)
Cultura / LCR e IEC / LCR	31 (16,8)	1 (3,2)	30 (96,8)
Cultura / LCR e IEC / soro	3 (2,4)	0 (0,0)	3 (100,0)
Cultura / LCR e IEC / LCR e IEC / soro	3 (2,4)	0 (0,0)	3 (100,0)

(12,0%), foi detectada a presença de antígeno de *N. meningitidis* grupo B, dos quais 8 foram positivas também nos exames de LCR e 7(5,6%) apenas na IEC de soro.

Nos casos em que a cultura se apresentou negativa, a IEC em amostras de LCR e/ou soro contribuiu para o diagnóstico de doença meningocócica grupo B em 26,7% dos casos, dos quais em 99,1% foi detectada a presença de antibacterianos no LCR.

A presença de agentes antibacterianos foi detectada em amostras de LCR de 45 pacientes dos quais 44 apresentaram IEC e LCR e/ou soro positiva e cultura de LCR negativa, e uma amostra de LCR positiva em ambos os métodos, ou seja, cultura e IEC.

A avaliação do desempenho diagnóstico da IEC em amostras de LCR em relação à cultura está apresentada na Tabela II.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Como citado anteriormente, o polissacaríde do meningococo grupo B é conhecido por sua pobre imunogenicidade. Contudo, o uso do anti-soro policlonal anti-*N. meningitidis* grupo B na IEC de LCR e/ou soro produzido na Seção de Imunologia desde 1986, em muito vem auxiliando no diagnóstico, não só em São Paulo, mas também em outros estados, principalmente no momento em que o Brasil se encontra com uma alta incidência de doença meningocócica grupo B.

Alguns autores relatam problemas com a sensibilidade da IEC para a detecção de polissacaríde do meningococo grupo B, não obtendo sucesso na detecção de antígenos, mesmo quando a cultura é positiva<sup>8, 12, 13, 19</sup>.

Empregando anticorpo monoclonal, COLL et alii<sup>5</sup> observaram que 17% dos casos analisados apresentaram antígenos polissacarídicos através da IEC em amostras de LCR de pacientes com meningite meningocócica do grupo B comprovada na cultura.

Analisando os resultados do nosso estudo, nota-se que a positividade da IEC em amostras de LCR nos casos com cultura positiva, foi de 19,2%, ligeiramente superior à relatada por COLL et alii<sup>5</sup>.

Considerando os resultados de positividade apenas na IEC do soro, foi observada uma percentagem de 5,6%, índice semelhante ao encontrado por Alkmin et alii (5,0%)<sup>3</sup>. Estes dados indicam que o uso de soro de pacientes na pesquisa de antígenos é exame complementar importante, principalmente quando o paciente está desenvolvendo uma septicemia. Os resultados obtidos são significantes, pois o método da IEC no LCR e/ou soro dos casos em que uma cultura de LCR se apresenta negativa, é capaz de contribuir para o diagnóstico, mesmo quando o paciente é submetido à antibioticoterapia prévia.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de Ana Vera Custódio e José de Jesus Chaves Nunes na realização da imunoeletroforese cruzada.

TABELA II

Avaliação do desempenho diagnóstico da técnica de imunoeletroforese cruzada em relação à cultura efetuada no líquido cefalorraquidiano de pacientes infectados com *N. meningitidis* grupo B.

ÍNDICES DE AVALIAÇÃO	CULTURA
Sensibilidade	0,472
Especificidade	0,938
Eficiência	0,756
Índice Kappa (K)	0,410
Conceito de K	Moderado

RIALA6/791

ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. - Contribution of counterimmunoelectrophoresis in cerebrospinal fluid and/or serum in the diagnosis of *Neisseria meningitidis* group B infections in Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):13-17, 1996.

ABSTRACT: Counterimmunoelectrophoresis (CIE) has been used to show the presence of *Neisseria meningitidis* group B antigen in 185 cerebrospinal fluid (CSF) and/or 125 serum samples. From the CSF samples, 103 (55.7%) were only culture positive and 36 (19.5%) showed only positive CIE reactions. In 34 (18.4%) of these samples both methods had positive results. Among patients who had negative CSF culture, CIE in CSF and/or serum contributed for the diagnosis of group B meningococcus disease in 26.7%, from which 99.1% had already received previous antibacterial therapy. Considering the only positive results by CIE in serum, it was observed a percentage of 5.6%. The contribution of CIE in CSF and/or serum was significant.

DESCRIPTORS: *Neisseria meningitidis* group B infections; counterimmunoelectrophoresis; diagnostic methods.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALKMIN, M.G.A.; SHIMIZU, S.H.; LANDGRAF, I.M.; GASPARI, E.N. & MELLES, C.E.A. - Production and immunochemical characterization of *Neisseria meningitidis* group B antiserum for the diagnosis of purulent meningitis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27:1627-1634, 1994.
2. ALKMIN, M.G.A.; MELLES, C.E.A. & LANGRAF, I.M. - Contribution of latex agglutination test for the diagnosis of pretreated meningitis. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease*, 7: 141-142, 1995.
3. ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M.L., VIEIRA, M.F.P.; CAMARGO, M.C.C. & GONÇALVES, M.I.C. - Diagnosis of bacterial meningitis and septicemia by serum counterimmunoelectrophoresis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 28:1065-1068, 1995.
4. BALLOWS, A. (Editor) - *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed., Washington, American Society for Microbiology, 1991.
5. COLL, P.; BORCHE, L.; AUSINA, V.; MIRELIS, B. & PRATS, G. - Dot-Immunobinding assay with a monoclonal antibody for detection of group B meningococcal antigen. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 5:44-46, 1986.
6. FASOLA, E. & FERRIERI, P. - Laboratory diagnostic methods for central nervous system infections. *Neurosurg. Clin. North Am.*, 3:279-289, 1992.
7. FINNE, J, MAKELA, P.H. & LEINONEN, M. - Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. *Lancet*, 1:355-357, 1983.
8. GHANASSIA, J.P.; SLIM, A.; BERGNONE-BEREZIN, E. & MODAI, J. - Failure of diagnosing group B meningococcal meningitis by immunoelectrophoresis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 9:313-314, 1977.
9. GOLD, R. - Clinical aspects of meningococcal disease. In: Vedros, N.A. - Evolution of meningococcal disease, CRC, Boca Raton, v.2, p. 69-97, 1987.
10. GOTSCHLICH, E.C.; LIU, T.Y. & ARNSTEIN, M.S. - Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.*, 129:1349-1365, 1969.
11. GREENWOOD, B.M; WHITTLE, H.C. & DOMINIC-RAJKOVIC, O. - Counter-current immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*, 2: 519-521, 1971.
12. JONES, D.M. & ABBOTT, J.D. - Diagnosis of pyogenic meningitis. *Lancet*, 2:257, 1976.
13. KALDOR, J., ASZNOVICZ, R. & BUIST, D.G.P. - Latex agglutination in diagnosis of bacterial infections with special reference to patients with meningitis and septicemia. *A. J. Clin. Path.*, 68: 284-289, 1977.
14. LANDGRAF, I.M.; ALKMIN, M.G.A. & VIEIRA, M.F.P. - Bacterial antigen detection in cerebrospinal fluid by the latex agglutination test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 37: 257-260, 1995.

15. MELLES, C.E.A.; LEE, I.M.L. & TAUNAY, A.E. - Pesquisa de antibacterianos no líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **44**: 155-159, 1984.
16. MORAIS, J.C.; PERKINS, B.A; CAMARGO, M.C.C.; HIDALGO, N.T.R.; BARBOSA, H.A.B.; SACCHI, C.T.; LANDGRAF, I.M; GATTAS, VL; VASCONCELOS, H.G.; ALIKAYTIS, B.D; WENGER, J.D. & BROOME, C.V. - Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil. *Lancet*, **340**: 1074-1078, 1992.
17. PANACHÃO, M.R.I.; KALLÁS, E.G.; BARBOSA, H.A., OKAI, M.I.C.G.; CAMARGO, M.C.C.; SACCHI, C.T., GORLA, M.C.O. & HIDALGO, N.T.R. - Group B meningococcal disease in São Paulo, Brazil: An epidemiological and microbiological study. In: *Neisseria 94 Proceedings of the Ninth International Pathogenic Neisseria Conference*. Evans, J.S.; Yost, S.E.; Maiden, M.C.J. & Feavers, I.M., eds.- Winchester, England, The Guildhall, p. 395, 1994.
18. SCHWARTZ, B.; MOORE, P.S. & BROOME, C.V.- Global epidemiology of meningococcal disease *clin. Microbiol. Rev.*, **2**: (suppl.1): S118-S124, 1989.
19. TILTON, R.C.; DIAS, F.& RYAN, R.W. - Comparative evaluation of three commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J.Clin. Microbiol.*, **20**: 231-234, 1984.

Recebido para publicação em 10/07/95

## RABIES VIRUS IN McCOY CELL LINE - PART III (PURIFICATION)\*

Yeda L. NOGUEIRA\*\*  
Julia M. Souza FELIPPE \*\*

RIALA6/792

NOGUEIRA, Y.L. and SOUZA FELIPPE, J.M.M. - Rabies Virus in McCoy cell line - Part III (Purification).  
*Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):19-26, 1996.

**ABSTRACT:** During this work Sokol's classical method, slightly modified, was used in order to obtain the purified fraction of rabies virus.

A filtration in Sephadex G-50 column took place followed by another filtration in Sephadex G-75, eliminating the enzymatic treatment with DNase and RNase.

The elution in Sephadex G-50 separated two peaks with activity in 280nm (Absorbance). Peak I has separated a bovine albumine serum and Peak II has separated most of the viral fraction purified, free of such contaminants as serum or cellular proteins. Peak I was submitted to a saccharose gradient clumping all viral particles components and they were biochemically characterized throughout the electrophoretic separation in poliacylamide gel SDS-PAGE and immunogenically throughout crossed immunoelectrophoresis.

Crossed immunoelectrophoresis was used to follow all the purification process, allowing the observation of which fractions were eliminated in each step of the process.

On the other hand, two advantages could be obtained when the bovine albumine serum was eliminated in second filtration through the Sephadex G-50 and when crossed immunoelectrophoresis technique allowed a complete peer-view of the process.

This approach is very interesting when a large scale production process of purified antigen is involved for it allows the control of the purity degree and the attainment of a good quality control of the product.

**DESCRIPTORS:** Rabies virus, McCoy cell line, Purification, Crossed immunoelectrophoresis and Glycoproteins.

### INTRODUCTION

According to Nogueira (*Part I and II*)<sup>8,9</sup> the evidence of cytopathic effect (CPE) in McCoy cell line infected with rabies virus is associated with virus replication and increase of the titer.

The rabies virus immunochemistry characteristics were observed during the process of purification.

Rabies virus multiplied and released in McCoy cell line, grown in supplemented media with foetal calf

serum was purified according to Sokol's<sup>11</sup> classical method submitted to some modifications. It was used ERA strain of rabies virus obtained after several passages in McCoy cell cultures.

During the purification process it was used the crossed-immunoelectrophoresis technique according to Laurell<sup>5</sup> and Week<sup>14</sup>, afterwards, this technique was standardized by Nogueira et alii<sup>7</sup>, in order to identify the immunogenic fractions from anti-rabic vaccine Fuenzalida-Palacios<sup>5</sup>.

The technique was adequate to make clear the purification process and constituted a simple and cheap method that could control the entire process.

\* Laboratório de Raiva do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo - Av. Doutor Arnaldo, 355 - CEP 01246-900 São Paulo - Brasil.

\*\* Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo - Av. Doutor Arnaldo, 355 - CEP 01246-900 - São Paulo - Brasil.

## MATERIALS AND METHODS

**VIRUS:** Rabies virus, ERA strain, that was successively passed in McCoy cell line was used. Infected cells from several passages maintained in Eagle's medium supplemented with 2% of foetal calf serum (FCS) showing titres that ranged from  $10^{4.5}$  to  $10^8$  LD<sub>50</sub>/0.03ml, were inoculated into the brains of newborn mice and the death rate was calculated by the Reed-Muench<sup>10</sup> method. These cells were frozen and thawed for three times and the cellular fluid was collected and processed according the diagram.

**VIRUS PURIFICATION:** The infected cellular fluid, after the freezing-and-thawing process, was centrifuged at  $1000 \times g$  for 20 minutes. The supernatant was poured and added of zinc acetate until reaching a 0.02 M. The pH was adjusted to 6.8 and the supernatant was kept at 4°C of temperature and it was centrifuged again at  $1000 \times g$  40 minutes. After that, the supernatant was discarded and to the precipitate was added a tris-phosphate EDTA 0,02 M Solution with pH = 7.8 (NTE) (1/80 of the original volume of the infected fluid). After centrifugation, the pellet was discarded and the supernatant was filtered through a Sephadex G-75 column.

**GEL FILTRATION:** All samples were tested for molecular integrity by two columns with 1.5 cm diameter and 50 cm of height were prepared for gel filtration. The first filtration was through Sephadex G-75 and the second was through Sephadex G-50; both were treated with tris-phosphate 0.02M at pH=7.8 (NT). Fractions were collected by continuous gravity current and the Sephadex G-75 filtration evidenced only peak between the fractions of the tubes 5 and 10. This peak was concentrated with the help of Amicon system of membranes and then went through the Sephadex G-50 column.

**SACHAROSE GRADIENT:** The peak obtained by Sephadex G-50 column was concentrated through a saccharose gradient (10% to 60% ) also buffered with tris-phosphate and centrifuged in a Beckman spin rotor 25.1. to  $61.000 \times g$  during 40 minutes at 4°C.

**CROSSED IMMUNOELECTROPHORESIS:** This technique was made during all the purification process with the objective of following each on the purification phases.

In the crossed immunoelectrophoresis the first step was carried out using agarose gel (medium type from Sigma Labs.), melted in a tris-barbiturate 0.02M, pH = 8.6 buffer.

The same buffer was used in the electrophoresis cube. The voltage was constant during the process and was 8-10 V/cm. During the first run, the duration was

1:30 hours and during the second run, performed across the first, with the hyperimmune serum containing in the gel, the duration was 3:00 hours.

Then the slides were washed in saline 0.15M several times in order to eliminate non precipitate serum and fixed in an ethanol/ methanol (50/50) solution. The slides were stained with an ethanol acetate acid/ brilliant Comassie blue G (500/500/0.5g) . To avoid excess of staining the slides were washed with solution containing ethanol/ acetic acid/deionated water (45/10/45) and were allowed to dry. The precipitated fractions could be seen, then , following the technique originally described by Week<sup>11</sup> .

**GEL ELECTROPHORESIS (SDS/PAGE):** The obtained peaks in two gel filtrations were submitted to an electrophoretic run in order to observe the polipeptides of the samples. Each sample was mixed (v/v) to the lysis buffer (1% Sodium Dodecyl Sulfate + 1% beta mercaptoethanol + 0.1% bromophenol blue). Each mixture was boiled to 100°C during 1 minute. The lysis product of each mixture was transferred in polyacrylamide gel prepared in a gradient varying from 7.5% to 12%, according Laemlli's<sup>12</sup> technique.

**IMMUNOENZIMATIC TEST:** It was performed to verify the recovery of the viral activity after concentration in the saccharose gradient.

The opalescent ring that is shown in a belt approximately 45% from the top of gradient was collected and dialysed against decreasing concentrations of saccharose (mol/liter). The final volume of 30 ml after dialysis, was divided into thirty/ 1 ml sample and they were tested against anti-rabic serum to detect viral activity.

It was used a flexible plastic plate with 96 holes, in each of them it was poured 15 ul of each one of the thirty fractions and the plate was maintained overnight at 4°C.

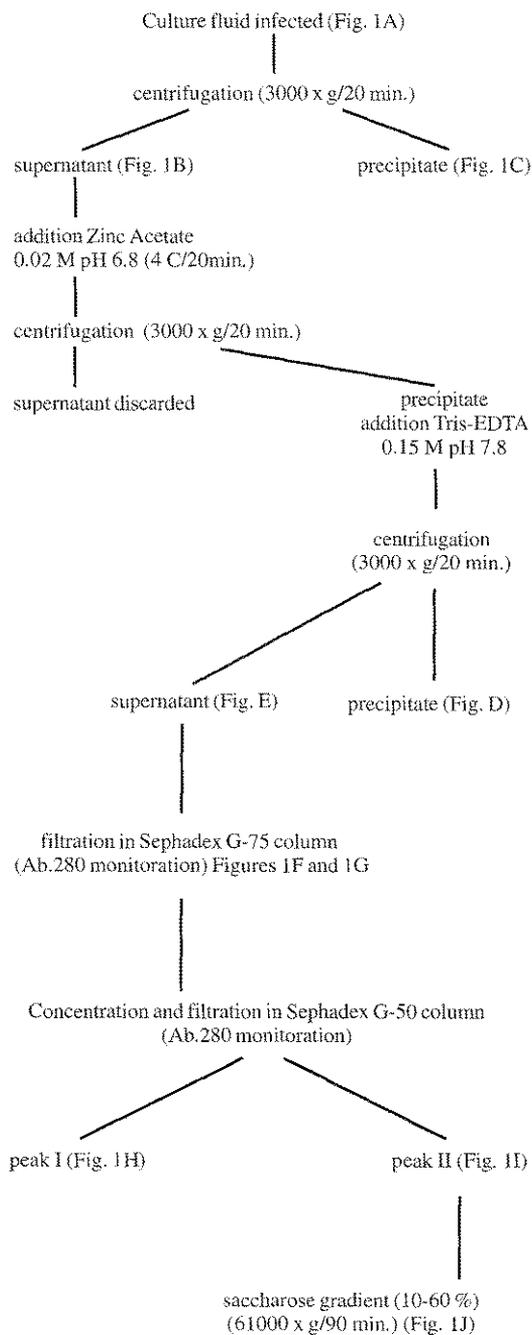
For the reaction antigen-antidoby 15 ul of anti-rabic serum was added and the plate was incubated at 37°C during 45 minutes, then the supernatant was discarded with the help of an adequate aspirator and the material was washed three times with buffered saline plus 0.03% of Tween (tensioactive agent); the excess of liquid was discarded and anti-IgG conjugate bound to peroxidase was added. The plate was incubated at 37°C for 30 minutes in a umid chamber and then washed again three times. Next step was added the cromogenic substrate, orto-phenildiamine (OPD) diluted in citrate buffer pH 5.4 and oxygenated water 0.03 v/v. As the enzymatic reaction was completed it was stopped with a sulfuric solution 4 n and the interpretation was done in an ELISA reader (wavelength 492nm). This test was made in triplicate and holes were used for controls.

## RESULTS

Each step of the purification process as presented in the Diagram 1 was followed by crossed immunoelectrophoresis technique.

The Figure 1A shows the beginning of the process: collected cellular fluid from several passages of rabies virus (ERA strain) in the McCoy cells.

### DIAGRAM OF VIRAL PURIFICATION



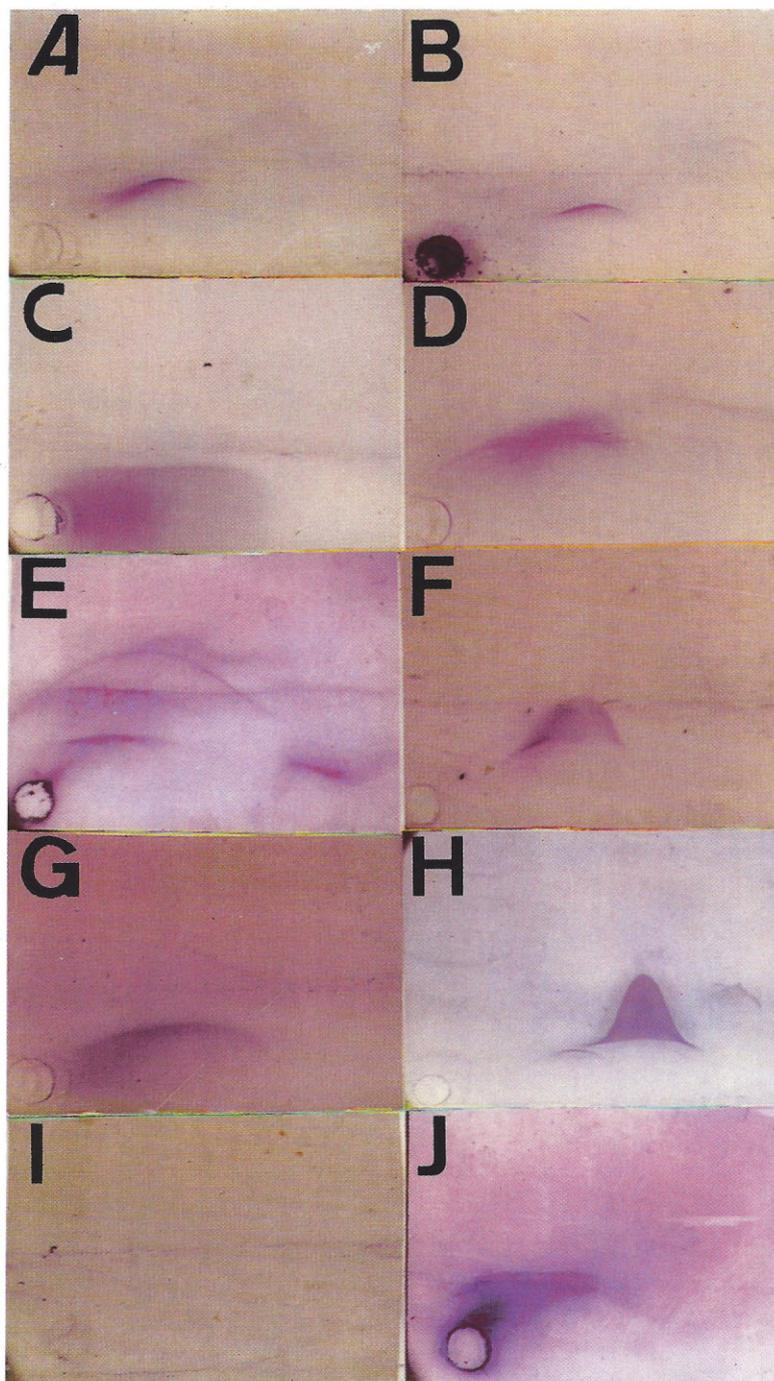


Figure 1: Crossed immunoelectrophoresis of each step of the purification process according to the Diagram.

- 1A: Infected cellular fluid;
- 1B: Supernatant after the first centrifugation;
- 1C: Precipitate from first centrifugation discarded;
- 1D: Precipitate from the third centrifugation (discarded);
- 1E: Supernatant before filtration in Sephadex G-75 column;
- 1F: Elution product of Sephadex G-75 column;
- 1G: Retained material in the column (eluate);
- 1H and 1I: Peaks I and II collected after filtration in Sephadex G-50 (280 nm of absorbance).
- 1J: Peak II after concentration in saccharose gradient.

According to Diagram 1 the first step of the process has eliminated all cellular debris. Figure 1B shows the supernatant after centrifugation at low speed: the precipitate (Figure 1C) was discarded.

Figure 1D is the precipitate obtained after the centrifugation obtained after precipitation with zinc acetate diluted in NTE buffer, while the Figure E represents the supernatant, which was eluted through Sephadex G-75 column (Figure 1F). This results is also show in the Figure 2. Figure 1G is retained material in Sephadex G-75, that is the elements of high molecular weights.

The elution product was concentrated by ultrafiltration with membranes of 0.015  $\mu$ m of porosity. The volume was reduced to 10% of the initial volume and then, the obtained product was eluted through Sephadex G-50 column. The eluted product show two well defined peaks at 280nm of absorbance (Figure 3, peak I and peak II), which are equivalent to Figure H and Figure I, respectively.

The Figure 4 shows the electrophoretic profile where lines 1 and 2 correspond to the patterns of molecular weights. Line 3 is product of peak I elu-

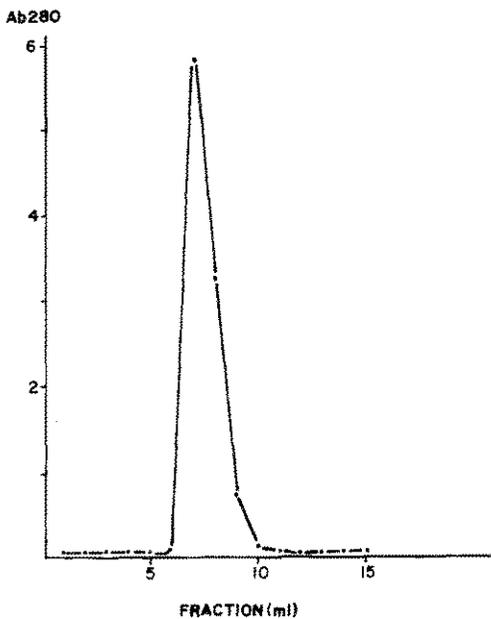


Figure 2: Chromatography in Sephadex G-75. System: Column (1.5 x 50 cm) eluted NTE buffer, Fraction collected (3 ml), collected (3 ml), monitored by Absorbance 280 nm.

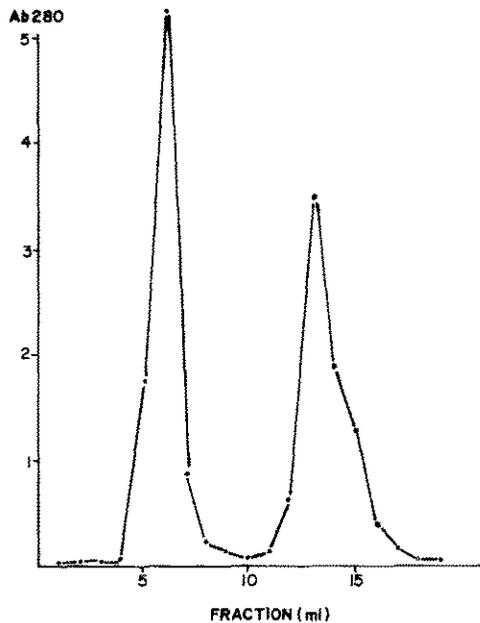


Figure 3: Chromatography in Sephadex G-50. System: Column (1.5 x 50 cm) eluted NTE buffer, Fraction collected (3 ml), collected (3 ml), monitored by Absorbance 280 nm.

tion and line 4 is the product of peak II while line 5 is peak II after concentration in saccharose gradient (equivalent to Figure J.)

In line 3 it can be observed one band with the same molecular weight of albumine that correspond to peak I and Figure 1H. In line 4 the presence of two bands

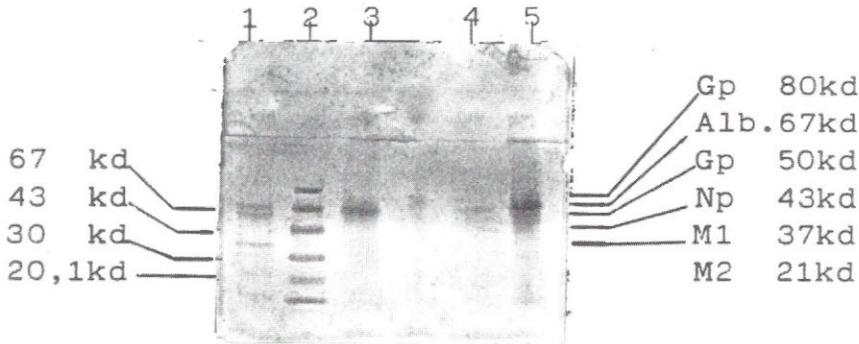


Figure 4: Electrophoretic separation in poliacrilamid gel SDS-PAGE.

Lane 1: high molecular weight  
Lane 2: low molecular weight  
Lane 3: Peak I (Sephadex G-50)

Lane 4: Peak II (Sephadex G-50)  
Lane 5: Peak II after concentration in saccharose gradient.

is observed, one more strongly stained with molecular weight near that of the albumine and other band weakly stained, that is difficult to see, with molecular weight around 50k daltons. However, in line 5, it can be better observed the concentrated material where several bands with similar molecular weight to that rabies of virus proteins appear: the glycoprotein (Gp) of 80 and 50k daltons, the nucleoprotein (N) of 43 k daltons and the proteins of the membrane (M1 and M2) with 37 and 21k daltons besides others proteins of low molecular weights but also much diluted.

#### DISCUSSION

In this work the purification of rabies virus multiplied in McCoy cell line was demonstrated and the characterization of biochemical and immunological aspects of viral fraction purified through the crossed immunoelectrophoresis following Week<sup>14</sup> is showed.

Sokol's<sup>11,12</sup> classical method was used for the purification with some modifications: the treatment with DNase and RNase after elution in Sephadex G-75 column was eliminated and it was introduced another elution with Sephadex G-50 instead of enzymatic treatment aiming at the elimination of the albumine fraction.

Neurath<sup>6</sup> et alii has demonstrated that rabies virus presents glycoproteins with 50 k daltons of molecular weight ; these glycoproteins are located in the spikes present in the viral envelope and are responsible for the immunogenicity of rabies virus.

Dietzschold<sup>2</sup> has isolated and has purified the glycoprotein located in the external wall of the virus membrane with help of a Sephadex G-200 column. He obtained a glycoprotein of 400k daltons of molecular weight "in natura". After a denaturation with detergent, Nonidet p40, and electrophoretic separation in

poliacrilamid gel SDS-PAGE it became demonstrated that this glycoprotein consisted of two chains of glycoproteins, one with molecular weight of 80k daltons and another with 50k daltons.

During this work, after the purification two proteins of molecular weights similar to that glycoprotein G(80k daltons and Gp 50) were evidenced and also contamination of bovine albumine fraction with molecular weight of 67k daltons from the serum and another components of the virion as nucleoprotein N (43k daltons) and membrane proteins M1(37 k daltons) and M2 (21k daltons).

After the electrophoretic separation on poli-acrilamid gel SDS PAGE it is difficult to identify which band correspond to Gp 50 or albumine, due to nearness of these two bands. However, with the crossed immunoelectrophoresis, technique this characterization became possible. As it can be observed in Figure 1H, according to Nogueira et alii<sup>7</sup> that characterized the immunogenic fractions of albumine and that of the viral fraction of the Fuenzalida - Palacios vaccine, the electrophoretic profile of albumine and that of the viral fraction are well defined.

The introduction of gel filtration in Sephadex G-50 showed efficiency in the resolution of both peaks, separating the albumine in peak I, thus making possible the elimination of the undesired contaminant, for the albumine is highly immunogenic during the immunization process. However, it is known that albumine protects the maintenance of viral titre during stockage at low temperature. So, it became possible to maintain the virus protected for long time, being this one of the adaptations to conditions of work in the laboratory.

Figure 1J shows crossed immunoelectrophoresis after concentration in saccharose gradient: it can be ob-

served two lines of precipitation what is in accordance to Neurath's<sup>6</sup> findings: he also noticed that, after the saccharose gradient, two lines of precipitation were observed in the Outcherlony technique.

However, in Figure 1I only one line of precipitation can be seen and it corresponds to peak II before concentration in saccharose gradient. In Figure 1J the precipitation main line presented an electrophoretic mobility distinct from its equivalent in Figure 1I. This result suggests that the saccharose gradient clumped particles that were dispersed and, due to the molarity variation in the gradient, the electrophoretic mobility probably could be altered.

In Whitt et alii<sup>5</sup> studies it became proved that the ionic strenght of the buffer in saccharose gradient turns the glycoprotein oligomer unstable causing the dissociation and solubilization of the glycoprotein. According to the same authors the oligomer should have a molecular weight upper 200k daltons: as was observed by Dietzschold<sup>2</sup> this oligomer is composed by three parts forming a dimer with molecular weight around 80k daltons and a monomer with molecular weight around 50k daltons, modifying the oligomeric structure of the virus glycoprotein, but it is important to notice that the sequence of the quaternary structure of the extra-celular dominium of the glycoprotein, exactly what gives immunogenicity, is not altered.

This methodology allowed the recovery of rabies

virus from McCoy cells culture, purified and free of contaminants or other cellular proteins, even considering that this purified fraction of the virus has not been tested in relation to its capacity of inducing protection or immunity.

Atanasiu et alii<sup>1</sup> reported in relation to a comparative study was made with vaccines obtained from three different cell lines, was demonstrated that, after purification of each vaccine the greatest part of the contaminants was eliminated but not those of cellular proteins. Perrin<sup>13</sup> discussed that in the purification processes, besides cellular contaminants some active viral particles and some epitopes (soluble glycoproteins) are lost.

However, the viral recovery was verified during the immunoenzimatic test by the viral activity: data not showed.

This study has demonstrated the antigenicity in rabies virus recovered in McCoy cell line. A favourable aspect of this preparative method was that we have a quantitative notion of the purified product and the level of the contaminants be maintained at the minimum possible.

This methodology enables a production process of the viral bulk in large scale and makes possible all process monitoration by an efficient not expensive method, allowing adequate quality control of the product.

RIALA6/792

NOGUEIRA, Y.L. and SOUZA FELIPPE, J.M.M. - Vírus Rábico em célula McCoy: Parte III (Purificação).  
*Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):19-26, 1996.

RESUMO: O vírus rábico replicado e liberado em cultura de células McCoy crescidas em meio suplementado com soro fetal bovino foi purificado de acordo com o clássico método de Sokol<sup>11,12</sup>, porém, submetido a algumas modificações.

Introduzimos a filtração em Sephadex G-50, em seguida a filtração em Sephadex G-75, eliminando o tratamento enzimático com DNase e RNase.

A eluição em Sephadex G-50 apresentou dois picos com atividade em 280 nm. O pico I continha soro albumina bovina e no pico II a maior parte da fração viral purificada livre de contaminantes como proteínas séricas ou celulares.

O pico I foi submetido à concentração em gradiente de sacarose, agrupando todos os componentes da partícula viral, sendo estes componentes caracterizados, bioquimicamente, através de separação eletroforética SDS-PAGE e imunoeletroforese bidimensional.

A imunoeletroforese bidimensional foi utilizada para acompanhar todo o processo de purificação, permitindo observar e visualizar quais frações foram eliminadas em cada etapa do processo.

Neste caso dupla vantagem verificou-se ao eliminar-se a soro albumina bovina com a introdução da segunda filtração em Sephadex G-50 e, conseqüentemente, a visualização através da técnica empregada, a imunoeletroforese bidimensional.

Esta abordagem é interessante nos processos de produção de antígenos purificados em larga escala, pois permite controlar o grau de pureza e obter um bom controle de qualidade do produto.

DESCRITORES: Vírus rábico, células McCoy, purificação, eletroforese bidimensional e glicoproteína.

REFERENCES

1. ATANASIU, P.; PERRIN, P.; SEGRE, L. & MANAGANAS. - O. Etude Comparative de Vaccins Rabiques Inactives Obtenus a l'Aide de Cellules Heterologues Diploides et Polyploides (HAK, BHk et Vero). *Archs. Inst. Pasteur de Tunis*, **58**(3-4), 401-421, 1981.
2. DIETZSCHOLD, B.; COX, J.H., SCHNEIDER, L.G.; WUNNER, W.H. & KOPROWISKI, H. - Isolation and Purification of Polymeric Form of the Glycoprotein of Rabies Virus. *J. Gen. Virol.*, **40**:131- 139-1978.
3. FUENZALIDA, E. & PALACIOS, R. - Un Método Mejorado en la Preparacion de la Vacuna Antirabica. *Bol. Inst. Bact. Chile*, **8**:3-10, 1955.
4. LAEMLLI, E.K. - Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1976.
5. LAURELL, C.B. - Antigen-Antibody Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **5**.10, 358, 1966.
6. NEURATH, A. R.; WIKTOR, T. J. & KOPROWSKI, H. - Density Gradient Centrifugation Studies on Rabies Virus. *J. Bacteriol.*, **92**, 102-106, 1966.
7. NOGUEIRA, Y.L. & MONTANO, J. - Crossed Immunoelectrophoresis as a method for Identification of Immunogenic Fractions Contaminated in the Suckling Mouse Brain Rabies Vaccine, and its Possible Use in the Prevention of Postvaccinal Neuroparalytic Accidents. *Arq. Biol. Tecnol.* **28**(2), 297-306, 1985.
8. NOGUEIRA, Y.L. - Rabies virus in McCoy cell line. Part I-Cytopathic Effect and Replication - *Rev. Inst. Adolfo Lutz* , 52(1/2):9-16, 1992.
9. NOGUEIRA, Y.L. & AMARAL, C.F.C. - Rabies virus in McCoy cell line. Part II - Titration - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **52**, 1/2:17-21, 1992.
10. REED-MUENCH, Methods for calculation of end point. In KAPLAN & KOPROWISKI, H. - *Laboratory Techniques in Rabies* 3rd ed., Geneve, WHO, p.348-354, 1973 (Monograph Series).
11. SOKOL, F. - Purification of Rabies Virus and Isolation of its Components. In : KAPLAN, M.M. and KOPROWISKI, H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization 1973:165-178. (Monograph Series).
12. SOKOL, F. SCHULENBERGER, H.D., WIKTOR, T. J. & KOPROWISKI, H. - Biochemical and Biophysical Studies on the Nucleocapsid and on RNA of Rabies Virus. *Virology*, **38**: 351 - 665, 1968.
13. PERRIN, P. & ATANASIU, P. - Rabies Glycoprotein Affinity for the Lipids I. - Structural Study of Different Spontaneous and Induced Associations. *Microbiologica*, **4**:231-247, 1981.
14. WEEK, B. - The Serum Proteins Identified by Means of Laurell Crossed Electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **25**:269.
15. WHITT, M.A.; BUONOCORE, L.; PREHAUD, C. & ROSE, J.K. - Membrane Fusion Activity, Oligomerization and Assembly of Rabies Virus Glycoprotein. *Virology*, **185**, 681-688, 1991.

Aknowledgements: The authors thank to Dra. Lia de Abreu Sacchetta for the revision of the manuscript and Sergio Viana from the Photography Section of Instituto Biológico for taking the photos.

Recebido para publicação em 31/10/95

## DENGUE: REVISÃO

Maria Luísa BARBOSA\*

RIALA6/793

BARBOSA, M. L. - DENGUE - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):27-45, 1996.

RESUMO: Este trabalho é uma revisão sobre vírus Dengue.

Numa tentativa de rever os conhecimentos acumulados, apresentando aspectos moleculares, diagnósticos e clínicos.

DESCRITORES: Vírus Dengue; Diagnóstico; Estrutura Molecular; Aspectos Clínicos.

### CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VÍRUS

A palavra vírus é originária do vocábulo latino *virus*, que significa veneno. Desde a Antiguidade eram noticiadas epidemias causadas por tais agentes, sem que, na época, sequer se cogitasse de sua existência.

Os primeiros experimentos que levaram à descoberta dos vírus, em 1892, foram feitos por IVANOVSKI e BEIJERINCK ao pesquisarem uma doença que ocorria em folhas de fumo, hoje denominada "mosaico do tabaco". No início deste século, LOEFFER & FROSCH conseguiram induzir a febre aftosa em bovinos e REED & CARROL a febre amarela. Em ambos os experimentos foi utilizado filtrado de material infectado e analisada a capacidade destes de causar infecção e doença. Estes pesquisadores, porém, não sabiam qual era o agente ou substância capaz de produzir as doenças (BUSBY & COLS., 1964).

Os vírus são extremamente simples e estão entre as menores formas de vida. São constituídos, basicamente, de ácidos nucleicos e proteínas. Sua simplicidade os torna parasitas intracelulares obrigatórios, isto é, vivem exclusivamente dentro de células hospedeiras, onde ocorre a multiplicação viral, levando a uma forte dependência da estrutura e do metabolismo destas células.

São considerados partículas infecciosas, pois são, potencialmente, capazes de produzir doenças, tendo um papel de destaque entre os agentes etiológicos de doenças infecto-contagiosas de importância socioeconômica e de Saúde Pública. Não podemos deixar de ressaltar que a maioria das infecções virais ocorre sem sintomas claros ou com sintomas inaparentes (sintomas subclínicos). Por outro lado, muitos vírus podem causar mais de um tipo de manifestação clínica, envolver mais de um sistema de órgãos e podem,

ainda, ser brandos ou fulminantes. Outro ponto a ser ressaltado é o fato de uma mesma doença (sintomas clínicos semelhantes) ser causada por diferentes vírus, como, por exemplo, as infecções respiratórias e as encefalites virais. Estas observações mostram que a identificação definitiva da etiologia de uma doença viral depende de testes laboratoriais.

Não podemos esquecer que estes organismos, sendo tão simples, têm um papel de destaque no desenvolvimento dos princípios gerais da biologia moderna. O conhecimento existente hoje, como a resposta da simplicidade de seu sistema genético e o mecanismo de seu funcionamento, é de fundamental importância para entender a estrutura e a função dos genes.

### CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS VÍRUS

Até 1966 a classificação dos vírus foi muito confusa, pois muitos pesquisadores e comitês isolados montavam diferentes esquemas de classificação. Somente naquele ano, durante o Congresso de Microbiologia, em Moscou, formou-se o Comitê Internacional de Nomenclatura dos Vírus (ICNV "International Committee on Nomenclature of Viruses"). Mais tarde, em 1973, recebeu a denominação de Comitê Internacional de Taxinomia dos Vírus (ICTV - "International Committee on Taxonomy of Viruses") (FENNER & PEREIRA, 1974; MATTHEWS, 1979; BROWN, 1986).

Nos últimos anos as técnicas usadas para classificação taxinômica incluem: morfologia de partícula viral (observada por microscopia eletrônica), características e estabilidade físico-químicas (comportamento em presença de solventes lipídicos e detergentes, variação de pH e temperatura etc), tamanho da partícula viral (por filtração através de fibras e micro-

\* Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

poros de diâmetro conhecido), material genético que compõe o vírus (DNA ou RNA) e características antigênicas dos vírus (por diferentes métodos sorológicos). Técnicas utilizando anticorpos monoclonais, síntese de peptídeos, análise do material genético e mapeamento epitópico possibilitaram um melhor entendimento das bases e a indução das respostas imunológicas.

#### *Arbovírus*

Entre os diferentes patógenos virais que afetam o homem deve ser destacado um grande grupo de vírus, designados genericamente de arbovírus ("Arthropod borne viruses" - Vírus transmitidos por artrópodos). Como definido pela Organização Mundial de Saúde (WHO - "World Health Organization"), "Arbovírus são vírus que se perpetuam, na natureza, principalmente devido à propagação biológica entre vertebrado hospedeiro suscetível e artrópodo hematófago ou pela transmissão transovariana ou venérea em artrópodos" (REHLE, 1989). A manutenção deste grupo ocorre, principalmente, por um ciclo contínuo de multiplicação viral, em tecidos dos artrópodos, e transmissão para os vertebrados, pela picada destes artrópodos produzindo viremia (SHOPE & SATHER, 1979).

Os arbovírus foram reunidos segundo as suas características epidemiológicas e algumas relações antigênicas. Estas podem ser verificadas por alguns testes sorológicos tais como: neutralização (NT), fixação de complemento (FC), inibição da hemaglutinação (HI) e distribuídos, de acordo com estas reações, em diferentes grupos (CALISHER & COLS., 1980). Dentro de um mesmo grupo alguns mostram uma relação mais íntima, formando um subgrupo ou complexo. Estes grupamentos virais foram confirmados por análises morfo genética e molecular, resultando na classificação taxonômica de: famílias, gêneros, sorogrupos, complexos, tipos, subtipos e variedades (topotipo) (KARABATSOS, 1985; CALISHER, 1980 e 1989).

Dos mais de 500 arbovírus reconhecidos e distribuídos mundialmente (KARABATSOS, 1985), por volta de 200 são conhecidos e suspeita-se que sejam transmitidos por mosquitos. Alguns destes são agentes patogênicos importantes para o homem, tais como: vírus da febre amarela (YF - "Yellow Fever"); vírus da dengue (DEN-Dengue); vírus da encefalite japonesa (JE - "Japanese Encephalitis"); vírus da encefalite de São Luís (SLE - "Saint Louis Encephalitis"); vírus da encefalite equina do leste (EEE - "Eastern Equine Encephalitis"), vírus da encefalite equina do oeste (WEE - "Western Equine Encephalitis") (KARABATSOS, 1985). No entanto, a infecção no homem não é essencial para a manutenção e disseminação de muitos arbovírus, e as doenças resultantes da infecção por estes agentes virais são consideradas zoonoses (DeFOLIART, 1987). O Brasil, particularmente a re-

gião amazônica, é recordista mundial em isolamento de arbovírus, contando até 1985 com 134 diferentes vírus, sendo 84 novos para o mundo (DeGALLIER & COLS., 1987; PINHEIRO, 1980).

Os arbovírus estão, atualmente, distribuídos em seis diferentes famílias: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Arenaviridae e Rhabdoviridae. Estas famílias podem conter alguns membros que não estão associados com a transmissão por artrópodos (REHLE, 1989).

#### *Flavivírus*

Até recentemente a família Flaviviridae continha somente um gênero, os *Flavivírus*. No entanto, as hepatites (COLLETT e COLS., 1988) e o vírus da hepatite C (o agente caracterizado como hepatite não A e não B) (CHOO & COLS., 1989) foram incluídos na família como 2 gêneros adicionais.

Da família Flaviviridae já foram isolados pelos menos 68 vírus (CALISHER e COLS., 1989) dos quais 26 (44%) são de importância médica, entre eles: febre amarela (YF), encefalite japonesa (JE) e encefalite transmitida por carrapato (TBE) (MONATH, 1990).

A manutenção destes vírus na natureza ocorre em um ciclo de transmissão que envolve mosquitos e carrapatos e vertebrados (CHAMBERLAIN, 1980). Apesar de estar distribuído ao redor do mundo, com exceção da região polar, um flavivírus específico pode ser geograficamente restrito a um continente ou parte dele, como por exemplo, o vírus Rocio (ROC), isolado por LOPEZ & COLS., (1978) no município de Rocio no Estado de São Paulo (SP). Muitas infecções por flavivírus não são caracterizadas devido à falta de pesquisa e às dificuldades médicas em algumas áreas geográficas afetadas. O controle de uma epidemia por flavivírus pode ser complexo e requer tempo e planejamento. As medidas de prevenção e profilaxia variam de acordo com diferentes aspectos. Pode ser uma campanha maciça de imunização, como no caso da febre amarela, e/ou redução do vetor, pela educação pública e eliminação do inseto por uso do inseticida em larga escala (epidemia de dengue ou febre amarela). A erradicação dos flavivírus, no mundo, é improvável por sua manutenção em animais reservatórios e por serem transmitidos transovariana ou venereamente nos artrópodos (REHLE, 1989).

#### *Multiplicação em Culturas de Células*

Flavivírus são pequenos vírus envelopados, com tamanho de 40 a 50nm de diâmetro, quimicamente compostos por proteínas, carboidratos, fosfolipídios e RNA, sendo um RNA genômico de fita simples e senso positivo, de mais ou menos 11 kb. Análises bioquímicas da organização e multiplicação viral demonstraram que os flavivírus são similares em

morfogênese, morfologia e estratégia de multiplicação (RICE & COLS., 1986; WESTAWAY, 1980; WESTAWAY, 1987).

Os flavivírus crescem em células de mamíferos, aves e insetos (KARABARTSOS, 1980). As etapas específicas, na replicação de flavivírus, não foram ainda descritas com detalhes. Os estágios iniciais da infecção, adesão e entrada nas células hospedeiras não foram identificados. Evidências sugerem que os vírus entram nas células por receptores de endocitose, mediadores por uma proteína de envelope (E) do vírus e receptores da membrana plasmática (GOLLINS & PORTERFIELD, 1985).

Estudos, por microscopia eletrônica (ME) da infecção com YF, ROC, "West Nile Fever" (WN) e kunjin (KUN) em células Vero têm localizado partícula viral desprovida de envelope e agregada à superfície das células (GOLLINS & PORTERFIELD, 1985; HATUNE, 1987; ISHAK & COLS., 1988; NG & LAU, 1988). Em fase posterior os vírus são encontrados em vesículas polissomais, onde uma fusão da membrana, catalizada por ácido, libera o nucleocapsídeo no citoplasma (GOLLINS & PORTERFIELD, 1986a e b).

A síntese de RNA viral pode ser detectada entre 3 a 6 horas após a infecção, com a liberação de partículas infecciosas iniciando-se em mais ou menos 12 horas. Embora a cinética de crescimento pareça similar em células de vertebrados e artrópodos, o título máximo em diferentes células pode variar consideravelmente (MUSSGAY & COLS., 1975).

Em células de vertebrados podem ser observadas alterações drásticas no citoplasma, incluindo vacuolização e proliferação de membranas intracelulares (MARPHY, 1980). A infecção é comumente citocida, embora algumas células de vertebrados não mostrem este efeito e tornam-se infectadas cronicamente (MARPHY, 1980). Células de insetos, tais como as linhagens contínuas, oriundas de *Aedes albopictus* ou *Aedes aegypti* (SINGH, 1971) e, particularmente, o clone C6/36 desenvolvem-se pela clonagem de células de larvas de *Aedes albopictus* (IGARASHI, 1978) podem demonstrar efeito citopático, com formação de sincícios até chegar a uma destruição celular extensa (SUITOR & COLS., 1969; TRENT & NAEVE, 1980; BRINTON, 1986; TESH, 1979; FIGUEIREDO, 1990; BARBOSA & COLS. 1993).

A replicação do RNA envolve a síntese das fitas negativas complementares, que são usadas como molde ("template") para a produção de fitas positivas, ou são traduzidas em um polipeptídeo. Pela localização das fitas de RNA em frações de células, a síntese de RNA ocorre, principalmente, na membrana do retículo endoplasmático perinuclear (BRINTON, 1986; TRENT & NAEVE, 1980; WESTAWAY, 1980; WESTAWAY, 1987). Subfrações,

são ricas em RNA polimerase dependente de RNA vírus específica (CHU & WESTAWAY, 1985; CHU & WESTAWAY, 1987; GRUN & BRINTON, 1986; WESTAWAY, 1987).

#### Dengue

O gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae foi dividido em sete complexos sorológicos, de conformidade com as reações cruzadas nos testes de neutralização. O uso de anticorpos monoclonais (Mabs) contribuiu para aumentar o conhecimento da estrutura antigênica destes vírus. Existem epítomos de grupo, de complexos, de tipos, de subtipos de linhagens e sublinhagens (TRENT, 1977; ROEHRIG & COLS., 1983; HENCHAL & COLS., 1982; HEINZ, 1986).

Os vírus dengue constituem um complexo antigênico da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus* (CALISHER & COLS., 1989); foram pela primeira vez isolados em camundongos, por SABIN & SCHLESINER em 1945 e a existência de mais que um sorotipo foi estabelecida por estudos de proteção em voluntários humanos (SABIN, 1952).

Existem quatro sorotipos distintos: dengue tipo 1 (DEN-1), dengue tipo 2 (DEN-2), dengue tipo 3 (DEN-3) e dengue tipo 4 (DEN-4), os quais podem ser diferenciados sorologicamente (WESTAWAY & COLS., 1985; DeMADRID & PORTERFIELD, 1974) e bioquimicamente (VEZZA & COLS., BLOCK & COLS., 1984). São transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*; no entanto, estudos realizados nas Filipinas, Indonésia e Ilhas do Pacífico demonstraram que *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis* são vetores potenciais na transmissão (GUBLER, 1988). Outros *Aedes ssp.*, vetores potenciais, são encontrados nos trópicos, onde mais da metade da população vive exposta à picada de mosquitos (HALSTEAD, 1980).

Os quatro sorotipos de dengue são importantes patógenos humanos e vêm afetando milhões de pessoas durante os dois últimos séculos. A partir da segunda guerra mundial, sua ocorrência tem aumentado, dramaticamente, com o progresso do transporte aéreo. A introdução dos diversos sorotipos do vírus, em muitas regiões do mundo, vem ocorrendo devido à urbanização dos trópicos, deficiência dos programas de controle do vetor (mosquito), deterioração dos programas de saúde pública e em decorrência de problemas econômicos e sociais. Em função das alterações dessas condições, a febre por dengue é, mundialmente a doença viral, transmitida por artrópodes, mais importante em termos de mortalidade e morbidade (GUBLER, 1987; HALSTEAD, 1988).

A dengue é uma doença ligada ao meio ambiente e, acima de tudo, a hábitos domésticos da população. Assim, o acúmulo de recipientes com água em residências, tais como vasos de flores, baldes, garrafas vazias, mangueiras e outros ornamentos, favorecem

a proliferação do vetor, que se multiplica em águas paradas e limpas (GUBLER, 1992).

O(s) sorotipo(s) envolvido(s) nas primeiras epidemias, nas Américas, não são conhecidos. Estudos sorológicos, realizados no Panamá, sugerem que o vírus DEN-2 foi responsável pela epidemia de 1941-42; porém, o DEN-3 também estava presente (ROSEN, 1974). Antes de 1980, muitas epidemias eram causadas por um ou, ocasionalmente, dois sorotipos de dengue, mas múltiplos sorotipos são agora endêmicos em diversas regiões e a situação de emergência, criada pelo dengue hemorrágico, como a febre hemorrágica do dengue ou a síndrome do choque por vírus dengue (DHF/DSS), tornou-se um grave problema de saúde pública, não só nas Américas, como em vários outros países (GUBLER & COLS., 1986; GUBLER, 1992).

Visto que DHF/DSS pode resultar da infecção sequencial de dois sorotipos diferentes, a introdução de um novo sorotipo em uma área, anteriormente infectada, é potencialmente perigosa. Afetando, predominantemente, crianças indígenas e jovens, a DHF/DSS foi considerada um grande problema pediátrico no sudeste da Ásia e oeste do Pacífico, com 600.000 casos de internação hospitalar e 20.000 mortes, nas duas regiões, em menos de 2 anos (HALSTEAD, 1988).

Nos últimos anos, a forma hemorrágica de dengue tem causado um maior número de mortes que outras doenças causadas por arbovírus. Nos seres humanos, os quatro sorotipos de dengue são responsáveis tanto pelo dengue clássico como pelo DHF/DSS (HALSTED, 1988).

A primeira epidemia de DHF/DSS nas Américas ocorreu em 1981, em Cuba (GUZMAN & COLS., 1984) e a segunda na Venezuela, em 1990. (OPAS, 1994). Em um intervalo de 10 anos, casos esporádicos de doença hemorrágica severa ou fatal, confirmados por exames laboratoriais, associados com dengue, foram reportados no México, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Jamaica, República Dominicana, Porto Rico, Santa Lúcia, Aruba, Brasil, Suriname, Colômbia e USA (não endêmico). Em Curaçau e Haiti foram descritos casos clínicos compatíveis com DHF, mas não foram confirmados laboratorialmente (GUBLER, 1992).

A distribuição dos quatro sorotipos de dengue alcançou proporções pandêmicas e existem estimativas de que a doença possa estar ocorrendo em 61 países, em uma população aproximada de 1,5 milhão de pessoas. A partir de 1986, houve uma expansão rápida do vírus e grandes epidemias têm ocorrido em países ou áreas que permaneceram livres do dengue, por períodos que variavam de 35 a 130 anos, incluindo: Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador, Peru e USA. Atualmente, a dengue é uma doença de caráter endêmico nos Trópicos, em particular, no Caribe e Ilhas do Pacífico (KAUFAMAN, 1987; GUBLER, 1992).

### 1. Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas da febre por dengue, em casos típicos, começa abruptamente, após 2-7 dias de período de incubação, com febre alta, dor de cabeça, dor retrobular. A febre pode permanecer por 6-7 dias. Os sintomas iniciais são seguidos por: mialgia generalizada, dor nos ossos que aumenta em severidade (doença popularmente denominada de "quebra ossos"), anorexia, náuseas, vômito, fraqueza e prostração. Sintomas respiratórios (tosse, dor de garganta e rinite) são comuns, principalmente em crianças. Exantema macular pode aparecer no primeiro ou no segundo dia. Já no terceiro ou quarto dia aparece um segundo exantema máculo papular ou mobiliforme e não irritante, localizado primeiro no tronco, espalhando-se para a face e lábios, podendo, ainda, descamar. Linfadenopatia generalizada, hiperestesia cutânea e sensação de tato alterado podem acompanhar estes passos da doença. Fenômenos hemorrágicos são notados em poucos casos e incluem petéquias, epistaxes, sangramento intestinal, menorragia e prova do laço positiva (SILER & COLS., 1926; SIMMONS e COLS., 1931; SABIN, 1952).

DHF/DSS é uma doença que se inicia de forma semelhante ao dengue clássico mas, 2-5 dias depois, progride rapidamente para uma forma severa com prostração, irritabilidade, choque com extremidades frias e úmidas, sudorese, cianose periférica, respiração rápida, pulso rápido e hipotensão. Ocorrem hemorragias espontâneas, incluindo petéquias, equimoses, epistaxes etc. Alterações físicas incluem hemorragias na pele, derrame pleural, alterações nos sinais vitais e hepatomegalia. Anormalidades laboratoriais incluem hematócrito elevado, trombocitopenia, hipoproteinemia, queda de complemento (especialmente C3), nível de fibrinogênio e a presença de produtos de fibrina dividida no plasma. A progressão do choque é rápida e, sem tratamento, 50% dos pacientes com DHF/DSS morrem. Entretanto, reconhecimento rápido e tratamento apropriado, principalmente hidratação, resultam em raros casos fatais, na ordem de 1% (COHIN & HALSTEAD, 1996; NIMMANILYA & COLS., 1969; HALSTEAD & COLS., 1970; SANGKAWIBHA & COLS., 1984; BURKER & COLS., 1988).

### 2. Como e Porque Ocorre DHF/DSS

DHF/DSS são síndromes severas e caracterizadas pelo aumento da permeabilidade vascular e hemorragia ("hemostasi") anormais. Ocorrem em indivíduos que já foram imunizados com um sorotipo de dengue (ou crianças com menos de um ano nascidas de mães dengue-imunizadas) e infectados por um segundo sorotipo. Os fagócitos mononucleados, onde o vírus se multiplica, são as células-alvo mais importantes da infecção por dengue (BOONPUCKNAVIG & COLS., 1981). Concentração subneutralizante de anticorpos para dengue aumentam a infecção do ví-

rus nestas células e embora os estudos sobre este assunto não sejam definitivos, a hipótese da imunidade aumentada ("enhancement") está baseada na premissa que um grande número de fagócitos mononucleados infectados, aumentem a severidade da doença (HALSTEAD, 1988).

Os princípios imunológicos, na DHF/DSS, estão ligados à existência na natureza de quatro tipos de dengue sorologicamente relacionados (WESTAWAY & COLS., 1985; DeMADRID & PORTERFIELD, 1974). Indivíduos infectados com um sorotipo tem imunidade por toda vida, para reinfeção pelo mesmo sorotipo, mas são suscetíveis à infecção com sorotipo heterólogo, após um pequeno período de proteção cruzada (SABIN, 1952). A DHF/DSS tem sido documentada somente em indivíduos com uma segunda, mas não com uma terceira ou quarta infecção por dengue (HALSTEAD, 1988).

O mecanismo patológico de DHF/DSS é uma das questões mais importantes da infecção por dengue e não está completamente elucidada. Tem sido sugerido que anticorpos pré-existentes (primeira infecção), responsáveis pela neutralização, aumentam a captação e multiplicação do vírus na célula-alvo, resultando na produção de anticorpo dependente (Antibody-Dependent enhancement-ADE), seguido de imunização por um vírus dengue heterotípico (ECKELS & COLS., 1985; HALSTEAD & COLS., 1984; HALSTED, 1988).

Teoricamente, pode ocorrer pelo menos duas razões pelas quais os anticorpos não sejam eficientes na neutralização dos vírus dengue, numa segunda infecção: primeira, pode faltar especificidade do anticorpo contra epítomos de outro sorotipo do vírus; segunda, os títulos de anticorpos homólogos podem ser baixos para se ligarem ao antígeno (HALSTEAD, 1988).

Tem sido sugerido, ainda, que a severidade da doença pode estar correlacionada com propriedades biológicas do vírus dengue (ROSEN, 1987; MORENS & COLS., 1991). Contudo, análises da sequência de proteínas do vírus dengue, de linhagens isoladas, tanto a partir de casos brandos como de casos severos, não revelaram substituição específica de aminoácidos associada à severidade da doença, não demonstrando uma alteração genética dos vírus envolvidos nas infecções (BLOK & COLS., 1989).

Algumas teorias foram propostas para explicar porque o aumento da multiplicação viral, em monócitos, leva à seqüelas hemorrágicas ou choque:

1-Foi verificado experimentalmente, em ratos, que a produção de uma linfocina, por linfócito-T aumenta a permeabilidade vascular, via histidina dependen-

te. É desconhecido o fato de uma linfocina semelhante ser produzida no ser humano (KHANNA & COLS., 1990; CHATURVED & COLS., 1980).

2-Monócitos infectados têm nível aumentado do complexo ativador-inibidor de plasminogênio (PAI-2) sobre sua superfície e isto poderia levar a um desequilíbrio na hemostase. É, entretanto, difícil explicar como um aumento de 2 a 3 vezes na concentração do PAI-2, na relativamente pequena quantidade de monócitos circulantes, levaria à drástica queda na contagem de plaquetas e aumento agudo da permeabilidade, que são características marcantes de DHF/DSS (KRISHNAMURTI & COLS., 1989).

3-Linfócitos humanos são estimulados a produzir interferon alfa e gama por monócitos infectados com dengue e por antígenos de dengue. É notório que interferon tardio inibe a multiplicação viral e pode, então, conter a ação do efeito do interferon gama (KURANE & ENNIS, 1987; KURANE & COLS., 1989).

4-Clones de linfócitos T apresentam reação cruzada para diferentes sorotipos de DEN e podem lisar células infectadas, sugerindo fazer parte deste processo na patogênese da DHF/DSS (KURANE & COLS., 1989).

### 3. Estrutura Molecular do Vírus Dengue

Como outros flavivírus, o vírus dengue é um vírus RNA, envelopado, contendo um nucleocapsídeo com RNA genômico de fita simples, senso positivo, aproximadamente 11Kb e 4,2 a 4,4 x 10<sup>6</sup> daltons (RICE & COLS., 1986; WESTAWAY, 1980; WESTAWAY, 1987). O terminal 5' do RNA genômico possui um "cap" tipo I (m7GppAmp) e conserva a seqüência dinucleotídica AG (CLARKE & COLS., 1987). Não possui a cauda poli A (poliadenina), característica de mRNA, no terminal 3'(RICE & COLS., 1986). Não produz RNA mensageiro subgenômico e tem um grande número de mRNA traduzido, completamente, nas células eucarióticas. Um aspecto bastante importante do genoma dos flavivírus é a presença de "Open Reading Frame" (ORF) de mais ou menos 10.000 pares de bases. Os ORFs de diferentes flavivírus começam no resíduo metionina indo até a base 10.158 em DEN-4, a 10.302 em "Murray Valley Encephalitis" (MVE) e é responsável pela codificação de poliproteínas de 3.386 a 3.434 aminoácidos (CHAMBERS, 1990a).

Esta poliproteína é processada, por proteinases virais e celulares, em proteínas estruturais e não estruturais, via co-tradução e pós-tradução, em associação com a membrana da célula hospedeira (RICE & COLS., 1985; CHAMBERS, 1990a; RICE & STRAUSS, 1990).

A ordem de codificação das proteínas ao longo do ORF é: 5'-C-prM(M)-E-NS<sub>1</sub>-NS<sub>2</sub>A-NS<sub>2</sub>B-NS<sub>3</sub>-NS<sub>4</sub>A-NS<sub>4</sub>B-NS<sub>5</sub>-3' onde:

C = proteína de capsídeo

prM = pré matriz-precursor da proteína de matriz

M = proteína de matriz

E = proteína de envelope

NS = proteínas não estruturais

No terminal 5', são codificadas as proteínas estruturais C, M, E, associadas ao vírus extracelular maduro. As proteínas não estruturais (NS) incluem três proteínas grandes, altamente conservadas, NS<sub>1</sub>, NS<sub>3</sub> e NS<sub>5</sub> e quatro proteínas menores, pouco conservadas, NS<sub>2</sub>A, NS<sub>2</sub>B, NS<sub>4</sub>A e NS<sub>4</sub>B, com atividades diversas (CHAMBERS, 1990a; COIA & COLS., 1988; DEUBEL & COLS., 1986; DEUBEL & COLS., 1988; IRIE & COLS., 1989; MACKOW & COLS., 1987; MANDL & COLS., 1989; OSATOMI & SUMIYOSHI, 1990; PLENEV & COLS., 1990; RICE & COLS., 1985, 1986; SUMIYOSHI & COLS., 1987; WESTAWAY, 1987; YAMSHCHIKOV & COMPANS, 1995; ZHAO & COLS., 1986).

As proteínas virais individuais são produzidas por clivagens proteolíticas de precursor (CHAMBERS & COLS., 1990a; CLEVES, 1985). A tradução experimental, usando células Vero (African Green Monkey) infectadas com vírus KUN, demonstra que as proteínas virais são sintetizadas na mesma ordem da seqüência genômica (SCHRADER & WESTAWAY, 1988).

Embora não haja prova rigorosa das várias etapas do processamento de poliproteínas em flavivírus, parece que a tradução está associada ao retículo endoplasmático rugoso (RER). Tradução, quebra, aquisição da topologia correta da proteína, reunião do complexo de replicação e morfogênese do vírus estão todos intimamente relacionados (CHAMBERS, 1990a).

#### 4. Proteínas Estruturais

A proteína C presente na partícula viral é pequena, com PM-12-14 kDa. Cópias múltiplas desta proteína, associadas com RNA viral, formam o nucleocapsídeo dos flavivírus e pode ser encontrada em diferentes formas (RICE & COLS., 1986; MARKOFF, 1989).

A seqüência de aminoácidos das proteínas C, dos diferentes flavivírus, apresenta pouca homologia nas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Quando sintetizadas, como parte da poliproteína, têm um domínio hidrofóbico no seu carboxi terminal, o qual aparentemente, atua como seqüência sinal para a inserção de prM no retículo endoplasmático rugoso (NOWAK & COLS., 1989).

A glicoproteína prM possui peso molecular de 18,1 a 19,0 kDa e é precursora da proteína estrutural M. (SPEIGHT & COLS., 1988). O processamento proteolítico de prM, para o produto M, é um processo tardio na maturação do flavivírus (RANDOLPH & COLS., 1990; GUIRAKHOO & COLS., 1991 e 1992). Esta quebra depende do envolvimento de um ácido e acredita-se que seja efetuada por uma protease da célula hospedeira (HEINZ & COLS., 1994; RANDOLPH & COLS., 1990). Análise dos vírus West Nile (WN), DEN-2 e TBE sugerem que a clivagem é necessária para a completa infectividade do vírus (WENGLER & WENGLER, 1989; RANDOLPH & COLS., 1990) e possível atividade de fusão à célula alvo (GUIRAKHOO & COLS., 1991). O processo de quebra pode ocorrer em vesículas ácidas do Complexo de Golgi, em um sítio fortemente básico (DEUBEL & COLS., 1986; RANDOLPH & COLS., 1990).

O segundo N-terminal do prM é, predominantemente, hidrofílico, contendo 6 resíduos de cisteína conservados, todos participando de pontes dissulfídicas e um número variável de sítios potenciais de glicosilação (NOWAK & WENGLER, 1987).

Na partícula intracelular, desprovida de envelope, a proteína prM está associada à proteína E, na conformação heterodimérica (WENGLER & WENGLER, 1989); a interação de prM com E parece ser necessária para a proteção de E nas trocas conformacionais irreversíveis, durante maturação dentro das vesículas ácidas e a exocitose (RANDOLPH & COLS., 1990a; GUIRAKHOO & COLS., 1992).

As proteínas prM e M são encontradas no vírus intracelular e extracelular, respectivamente. A função da proteína M no vírus é ainda desconhecida. (MURRAY & COLS., 1993; RANDOLPH & COLS., 1990; YAMSHCHIKOV & COMPANS, 1993).

A proteína E é a maior proteína estrutural da partícula viral, com um peso molecular de 53 a 58 kDa. Esta proteína é importante em diversas atividades biológicas, incluindo: montagem do vírus (maturação), fusão celular (possui receptores de ligação), indução de anticorpos neutralizantes, imunidade protetora, produção de anticorpos que inibem a aglutinação de eritrócitos e é um dos antígenos mais importantes, para diagnóstico (HEINZ, 1986; SMITH & WRIGHT, 1985).

A proteína E deve sofrer rearranjo conformacional induzido por pH ácido (GUIRAKHOO & COLS., 1989), que parece ser crucial para a capacidade de infectividade do vírus. Tem-se aventado a hipótese que pH ácido favorece a entrada de flavivírus no citoplasma, o qual parece estimular fusão das membranas virais e da célula hospedeira (GOLLINS & PORTERFIELD, 1986b; KIMURA & OHYAMA, 1988; GHIRAKHOO & COLS., 1989; HASE & COLS., 1989; SUMMERS

& COLS., 1989; RANDOLPH & STOLLAR, 1990; GUIRAKHOO & COLS., 1991).

Na proteína E foram definidos três domínios antigênicos, I, II e III, que correspondem à entidades estruturais diferentes. O domínio I é estabilizado por quatro pontes dissulfídicas mas, trocas conformacionais são induzidas com tratamento em pH ácido e dodecil sulfato de sódio (SDS) (ROEHRING & COLS., 1990). Uma seqüência consenso, que vai do aminoácido 98 a 111, está localizada neste domínio e pode corresponder à seqüência que responde pela fusão. Um segundo domínio (II), cercado de uma região de alta variabilidade, carregando uma cadeia lateral, é encontrado na maioria dos vírus do complexo TBE, JE e DEN. Tem-se demonstrado que o domínio III de JE e DEN-1 contém um fragmento de mais ou menos 100 aminoácidos, requerendo uma ponte dissulfito N-terminal entre a cisteína 304 e 335 ou 302 a 333, respectivamente, para manter a estrutura conformacional dos sítios antigênicos (ROEHRING & COLS., 1990) (o domínio III foi definido como domínio II por MASON & COLS., 1990).

A proteína E, do vírus dengue, contém determinantes antigênicos sorotipo específicos que partipam do processo de neutralização do vírus (GENTRY & COLS., 1982). Anticorpos monoclonais (MAbs), específicos, para proteína E, são capazes de, passivamente, proteger camundongos de uma infecção por dengue (KAUFMAN & COLS., 1987).

A proteína E do dengue contém 2 sítios para glicosilação (SMITH & WRIGHT, 1985), mediando a ligação do vírus a receptores de superfície da célula hospedeira e os passos de fusão intraendossomal (STEPHENSON, 1988). O desenvolvimento da tecnologia de MAbs, informação sobre seqüências gênicas, o uso de quebras de fragmentos de proteínas ou peptídeos sintéticos permitiu que muitas das propriedades conformacionais e funcionais das proteínas E dos flavivírus fossem determinadas (HEINZ, 1986; ROEHRING & COLS., 1989, 1990).

Análises dos MAbs contra glicoproteína E, de Den-2, permitiram a identificação de 7 epítomos (HENCHAL & COLS., 1985) MEGRET & COLS. (1992), empregando a técnica de "immunoblotting", mapearam epítomos desta proteína em DEN, utilizando MAbs contra fragmentos de proteína E, expressos por produtos fusão de plasmídeo trpE-E em *E.coli*.

### 5. Proteínas não estruturais

A proteína não estrutural NS<sub>1</sub>, nos 4 sorotipos de DEN, tem peso molecular que varia de 35 a 53 kDa, apresentando diferentes pontos isoeletrícos; contém resíduos de 12 cisteína conservadas (exceto em DEN-4) e sítios de glicosilação em posições invariáveis (MACKOW & COLS., 1987).

Esta proteína pode ser expressa tanto em associação com a superfície celular como dentro das células infectadas por dengue (CARDIFF & LUND, 1976), podendo ser, ainda, encontrada com o antígeno solúvel, fixando complemento em sobrenadante de cultura de célula e em soros de camundongos infectados com dengue (BRANDT & COLS., 1970a,b). O domínio hidrofóbico do C-terminal de NS<sub>1</sub> pode servir como um sinal para ligação da proteína na membrana. O seu papel na replicação do vírus não é conhecido. O fato de estar presente em grande quantidade em células infectadas com DEN-2, sugere que ela pode estar relacionada com a montagem e maturação dos vírus (RICE & COLS., 1986).

A glicoproteína NS<sub>1</sub> pode ter um papel importante na resposta imune para infecção por vírus dengue, desde que a imunização passiva ou ativa possa proteger camundongos contra o desafio do vírus letal (SCHLESINGER & COLS., 1987). Juntamente com a glicoproteína E, parece ser a candidata mais provável para o desenvolvimento de uma vacina (MASON & COLS., 1990; BLITVICH & COLS., 1995).

NS<sub>2</sub>A, NS<sub>2</sub>B, NS<sub>4</sub>A e NS<sub>4</sub>B são proteínas não estruturais, pequenas, hidrofóbicas, talvez associadas às membranas e pobremente conservadas entre os flavivírus (MANDL & COLS., 1989; RICE & COLS., 1986; SPEIGHT & WESTAWAY, 1989).

Para as proteínas NS<sub>2</sub>A e NS<sub>2</sub>B foi proposta uma atividade de protease. Papel bioquímico específico para NS<sub>4</sub>A e NS<sub>4</sub>B não tem sido demonstrado, mas é aventada a possibilidade de estarem envolvidas no estabelecimento do complexo de replicação (RICE & COLS., 1986; PREUGSCHAT & COLS., 1990; FALGOUT & COLS., 1991). Nenhuma modificação pós-traducional é conhecida nestas proteínas, a despeito da existência de um sítio N-ligado à glicosilação, conservado na porção C-terminal de NS<sub>4</sub>B (LEE & COLS., 1990).

NS<sub>3</sub> é a segunda maior proteína viral (PM 68 a 70 kDa), altamente conservada entre os flavivírus (MANDL & COLS., 1989; (RICE & COLS., 1986), parecendo ter um papel importante na replicação viral. Comparações, em sua seqüência de aminoácidos, sugerem que esta proteína é no mínimo bifuncional, contendo tanto uma atividade de protease como uma atividade de nucleotídeo trifosfatase/helicase, RNA dependente de RNA. Estas funções próprias sugerem uma localização citoplasmática para NS<sub>3</sub> (GORBALENYA & COLS., 1989).

NS<sub>5</sub> é a maior (PM 103 a 104 kDa) e a mais conservada proteína dos flavivírus; possui estrutura básica e não contém nenhuma seqüência hidrofóbica longa. O papel provável de NS<sub>5</sub> pode ser o de RNA polimerase viral e a localização da sua porção N-terminal obtida por clivagem, presumivelmente por NS<sub>3</sub>, ou uma protease alternativa, em compartimento cito-

plasmático, sugere que NS<sub>3</sub> está localizada no citoplasma, embora associada à membranas (MANDL & COLS., 1989; CHAMBERS, 1990a).

#### 6. Processamento da poliproteína

Análise da seqüência de aminoácido, perto dos sítios de clivagem das poliproteínas dos flavivírus, indica que existem várias classes distintas do mecanismo de quebra.

A poliproteína, na co- e pós-tradução, é processada pela proteinase viral NS<sub>3</sub>, em associação às proteinases da célula hospedeira (CHAMBERS & COLS., 1990a e c). Peptidases sinais, da célula hospedeira, que, no geral, clivam co-tradução e funcionam no lúmen do retículo endoplasmático, estão envolvidas no processamento das proteínas estruturais. A proteinase NS<sub>3</sub>, que talvez funcione no citossol, está envolvida na produção do N-terminal das proteínas não estruturais NS<sub>2</sub>B e NS<sub>3</sub>, e podem, ainda, quebrar a poliproteína para produzir a porção N-terminal de NS<sub>4</sub>A e de NS<sub>5</sub> (PREUGSCHAT & COLS., 1990; CHAMBERS e COLS., 1990 a & c; RICE e STRAUSS, 1990).

Experimentos de expressão "in vivo" e "in vitro", bem como experimentos de deleção têm estabelecido, com segurança, que NS<sub>2</sub>B é absolutamente requerido, em adição à NS<sub>3</sub>, para processamento da poliproteína de flavivírus, mas os resíduos funcionais dentro de NS<sub>2</sub>B e o mecanismo pelo qual NS<sub>2</sub>B participa na atividade proteinase não foram ainda definidos (PREUGSCHAT & STRAUSS, 1990; CHAMBERS & COLS., 1991; FALGOUT & COLS., 1991).

YAMSHCHIKOV & COMPANS (1993) propuseram um modelo de clivagem para C/prM. Neste modelo, o processamento ocorre com eficiência só na presença da protease viral NS<sub>2</sub>B-NS<sub>3</sub> (CHAMBERS & COLS., 1990a). Já as quebras de prM/E; E/NS<sub>1</sub> e NS<sub>4</sub>A/NS<sub>4</sub>B parecem ser mediadas por sinais (RICE e COLS., 1985; SPEIGHT e COLS., 1988) da célula hospedeira (BIEDRZYCKA & COLS., 1987; NOVAK & COLS., 1989; RUIZ LINARES & COLS., 1989; SPEIGHT & COLS., 1988; WRIGHT & COLS., 1989). As proteases que clivam as ligações NS<sub>1</sub>/NS<sub>2</sub>A não foram identificadas, embora seqüências encontradas dentro de NS<sub>2</sub>A parecem ser requeridas para quebra característica da junção NS<sub>1</sub>/NS<sub>2</sub>A (FALGOUT & COLS., 1989).

Parece que a quebra entre NS<sub>1</sub>A e NS<sub>2</sub>B é mediada por uma proteína viral codificada com especificidade única. PREUGSCHAT & STRAUSS (1991) mostraram que a região N-terminal de NS<sub>1</sub>A é produzida pela proteinase viral NS<sub>3</sub> e que NS<sub>2</sub>B, também, é pós-traducionalmente modificada na célula infectada.

FALGOUT & COLS., (1991) realizaram estudos

para analisar as clivagens poliproteicas de DEN-4 e identificar as funções virais que são necessárias para que ocorram os eventos proteolíticos. Estes autores mostraram que NS<sub>2</sub>A é requerido para quebrar NS<sub>2</sub>/NS<sub>2</sub>A. Foram descritas evidências de que NS<sub>2</sub>B e NS<sub>3</sub> são requeridas para a quebra de NS<sub>2</sub>A/NS<sub>2</sub>B e NS<sub>2</sub>B/NS<sub>3</sub>, bem como, NS<sub>2</sub>B é necessário para a quebra de NS<sub>2</sub>/NS<sub>1</sub>A e aparentemente, várias outras clivagens específicas dentro de NS<sub>3</sub>.

#### 7. Diagnóstico Laboratorial

As viroses por dengue estão entre os flavivírus mais difíceis de isolamento e propagação (GUBLER, 1988). Inicialmente, eram usados, apenas, dois métodos para isolamento primário de flavivírus: inoculação em camundongo recém-nascido e cultura de células de vertebrados (Vero, BHK, LLC-MK2) (KARABATSOS, 1980, 1985). Estes sistemas, no entanto, são de valor limitado no isolamento do vírus dengue, uma vez que, usualmente, não são patogênicos para camundongo recém-nascidos e muitos não produzem CPE ou placas em culturas de células de vertebrados em passagens iniciais (ROSEN & GUBLER, 1974; GUBLER, 1988).

ROSEN & GLUBER (1974) desenvolveram uma nova técnica de isolamento do vírus dengue, na qual os espécimens eram inoculados diretamente em mosquitos *Aedes albopictus* adultos.

O método mostrou-se sensível e relativamente rápido, pois os mosquitos são hospedeiros naturais destes vírus, sendo, portanto, altamente suscetíveis à infecção e à replicação do vírus. No entanto, a técnica de inoculação em mosquito, apesar de muito sensível, requer habilidade na inoculação e ambiente adequado para criação do inseto. Por estas razões não é muito prático no diagnóstico laboratorial de rotina (ROSEN & GUBLER, 1974; KUBERSKI & ROSEN, 1977).

SINGH & PAUL (1969) reportaram, pela primeira vez, o isolamento do vírus dengue em cultura de células de *Aedes albopictus*. A partir deste período várias linhagens celulares de inseto vêm sendo utilizadas para esse propósito, tais como: *Aedes aegypti*, *Toxyrhyngites amboinensis* (TRA), *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61), *Aedes albopictus* e, particularmente, o clone C6/36, desenvolvido pela clonagem da linhagem *Aedes albopictus* (SINGH, 1967; 1971; VARMA & COLS., 1974; IGARASHI, 1978; TESH, 1979; KUNO, 1982, 1983, KUNO & COLS., 1985; SINARACHATMANT & OLSON, 1973).

Estas linhagens apresentam como vantagem, no isolamento do vírus dengue sobre as culturas de células de vertebrados (RACE & COLS., 1979; CHAPPELL & COLS., 1971), a sensibilidade, o fácil crescimento e manutenção à temperatura de 28°C (SINGH &

PAUL, 1969; IGARASHI, 1978; VARMA & COLS., 1974).

Sabe-se que células de mosquito, infectadas com flavivírus, podem ou não apresentar CPE, dependendo do vírus e da célula hospedeira (HENCHAL & PUTNAK, 1990; ELIOTT & WILKIE, 1986). Em dois estudos comparativos das linhagens, TRA-284, AP-61 e C6/36 observou-se que a linhagem celular TRA-284 foi mais sensível à infecção pelo vírus dengue selvagem. Mesmo assim, esta linhagem apresenta um grau de sensibilidade menor que a técnica de inoculação em mosquito. Estas células foram adaptadas em meio sem soro e cultivadas em garrafas ou tubos de vidro, sendo então denominadas TRA-284-SFG (KUNO & COLS., 1985; GUBLER, 1988).

A TRA-284-SFG, (adaptada para crescer em suportes de vidro) no entanto, tem crescimento lento, particularmente nos dois primeiros dias e o rendimento dos repiques é de 1:3 ou no máximo 1:4, proporções superiores resultam em monocamadas incompletas. As células devem ser separadas e ressuspensas gentilmente, e apesar de todos estes cuidados a maioria das garrafas e tubos, geralmente, apresentam um grande número de células em grumo. A detecção do vírus só pode ser feita através da IFI, uma vez que estas células não apresentam CPE.

Devido a estas dificuldades no cultivo da TRA-284-SFG, e apesar de existirem várias culturas de células, de vertebrados ou invertebrados, para o isolamento de flavivírus (KUNO, 1982; GUBLER & COLS., 1984; KUNO & COLS., 1985), o método rotineiro de isolamento do vírus dengue, hoje, é a inoculação em células de mosquito, clone C3/36 (IGARASHI, 1978).

Assim, para a vigilância epidemiológica de dengue, as culturas de células de mosquito podem ser usados por laboratórios de virologia com rotina em cultura de células; elas consomem menos tempo e um grande número de amostras podem ser processadas.

A identificação dos vírus dengue isolados é realizada por imunofluorescência indireta (IFI). A IFI com Mabs permite a identificação dos sorotipos isolados, em baixas passagens (KUBERSKI & ROSEN, 1977; HENCHAL & COLS., 1982, 1983).

A utilização de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico de dengue pode permitir o desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis e específicos.

Técnicas de hibridização do ácido nucléico têm se mostrado cada vez mais úteis no diagnóstico viral. A detecção do agente viral pode ser realizada por hibridização "in situ", em suporte de membrana de nitrocelulose ou "nylon" (Southern blot, Northern blot ou dot blot), usando como molde (probe), frag-

mentos de RNA, cDNA ou oligonucleotídeo sintético marcados (OLSON & COLS., 1988; CHANDLER & COLS., 1993; KILLEN & SULLIVAN, 1993).

Análises por impressão digital ("Fingerprinting"), de oligonucleotídeos ou polimorfismo de sítios de restrição, são usadas como metodologia epidemiológica para estudo da divergência gênica de vírus isolados a partir de diferentes regiões geográficas. Estudos com DEN-1 (REPIK & COLS., 1983), DEN-2 (TRENT & COLS., 1989; TRENT & COLS., 1983), DEN-3 (HENCHAL & COLS., 1986), MVE (LOBIGS & COLS., 1986), SLE (TRENT & COLS., 1981, 1987) e YF (DEUBEL & COLS., 1986) revelaram considerável homogeneidade genética, embora variedades virais diferentes possam ser detectadas e correlacionadas com a origem geográfica.

Cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue é antigenicamente distinto, apresentando uma única imagem de "fingerprint", de oligonucleotídeo e modelo específico de restrição para eDNA (VEZZA & COLS., 1980; BLOCK, 1985). Os sorotipos de dengue isolados em diferentes partes do mundo, têm sido ainda classificados em topotipos, quando existe mais de 70% de similaridade entre eles (TRENT & COLS., 1981, 1990).

Estudos do seqüenciamento de vírus representativos dos quatro sorotipos de dengue contribuíram para o entendimento da estrutura e inter-relação destes vírus, demonstrando uma similaridade de 70% na seqüência de aminoácidos entre os quatro sorotipos e cerca de 50% de similaridade com outros membros da família Flaviridae, tais como o YF e o JE (FU & COLS., 1992; HAHN & COLS., 1988; MACKOW & COLS., 1987; OSATOMI & SUMIYOSHI, 1990).

A utilização da técnica de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction-PCR) é uma alternativa, na identificação dos vírus dengue, pois em algumas horas pode-se obter grande quantidade do material genético do vírus, a partir de amostras de soro ou lesões teciduais (OPAS, 1994), este material pode, então, ser analisado por seqüenciamento, hibridização, eletroforese em gel de agarose ou ainda por padrão de restrição (HENCHAL & COLS., 1991, 1994; LANCIOTTI & COLS., 1992; CHANDLER & COLS., 1993; MORITA & COLS., 1991, 1994).

No entanto, estas técnicas só podem, ainda, ser utilizadas por alguns laboratórios de referência, uma vez que requerem técnicos especializados, equipamentos relativamente caros e reagentes puros e que sejam transportados e estocados adequadamente. Todos estes requisitos tornam difícil a utilização de tais técnicas na maioria dos laboratórios de saúde pública, nos países em desenvolvimento.

Muitas infecções por flavivírus são diagnosticadas por testes sorológicos, para a detecção de anticorpos específicos, destacando-se entre estes: HI (CLARK &

CASALS., 1958), FC (ROSEN & GUBLER, 1974; KUBERSKI & ROSEN, 1977 a; TESH, 1979), NT (RUSSELL & COLS., 1972; RUSSELL & NISALAK, 1967; RUSSELL & McCOWN, 1972) e ensaios enzimáticos por captura de IgM (MAC-ELISA) (KUNO & COLS., 1987).

O teste HI detecta determinantes antigênicos grupo-reativos, o de FC é intermediário em especificidade e o teste de NT é considerado tipo específico. O teste de NT é usado, também, para a identificação de vírus e definição dos subgrupos intimamente relacionados (CALISHER & COLS., 1989).

Os anticorpos de grupo dos flavivírus são responsáveis pelo alto grau de reação cruzada, particularmente em FC e HI, resultando na dificuldade de interpretação dos testes sorológicos. Além disso, FC, HI e NT requerem amostras pareadas de soros dos casos suspeitos; por consequência, a confirmação laboratorial se torna demorada (OPAS, 1994).

Por outro lado, MAC-ELISA requer somente uma amostra de soro, pois detecta imunoglobulinas da classe IgM, que indicam infecções recentes, razão pela qual vem sendo largamente utilizado. No entanto, este teste detecta apenas o complexo dengue, não sendo possível distinguir dengue tipo específico, bem como infecções simultâneas por mais de um flavivírus (RACE; 1979; TESH, 1979; OPAS, 1994).

A interpretação de um teste sorológico pode ser, na maioria das vezes, difícil, pois anticorpos anti-flavivírus podem apresentar reações cruzadas. Assim, infecção pregressa ou a aplicação de uma vacina podem induzir à formação de anticorpos que são detectados pelas provas sorológicas convencionais (MONATH, 1990).

A especificidade antigênica para proteínas virais pode ser determinada por "dot-blot" ou "imunoblotting"

(KAUFMANN, 1987). A combinação dos testes de eletroforese e "Western Blot" para a caracterização de anticorpos contra proteínas de dengue tem sido de grande vantagem, pois estes ensaios podem fornecer respostas quantitativas e qualitativas para proteínas virais estruturais e não estruturais, num só tempo (CHURDBOONCHAT & COLS., 1987, 1991; WINKLER & COLS., 1988; FEIGHNY & COLS., 1992; PRYOR & WRIGHT, 1994).

Consideráveis esforços vêm sendo empregados para o desenvolvimento de uma vacina para dengue; no entanto, até o momento a eficiência das diferentes vacinas é limitada a um dos sorotipos. Muita atenção tem sido direcionada para o sorotipo 2, por ser o mais relacionado a DHF/DSS (SANGKWIBBA & COLS., 1984; BHAMARAPRAVATI & COLS., 1987). A produção de uma vacina eficiente para DEN-2, não solucionaria o problema, uma vez que a imunização por um único sorotipo, mesmo sendo DEN-2, não protege o indivíduo contra DHF/DSS. Vacinas efetivas existem para três flavivírus: YF, JE e TBE. Tentativas para se produzir vacinas eficientes para outros flavivírus foram realizadas com vírus atenuado ou inativado (ECKLS & COLS., 1984; 1985; 1988).

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e sua aplicação para o estudo da estrutura e expressão do genoma dos flavivírus abriu uma nova possibilidade para a produção de vacinas de flavivírus, utilizando-se subunidades recombinantes, em particular as proteínas E (KONISHI & COLS., 1991; GALLER, 1993; VENUGOPAL & GOULG, 1994).

#### AGRADECIMENTOS

A autora gostaria de agradecer à Dra. Julia M.M. Souza Felipe, Teresa Keico Nagasse-Sugahara e Iray Maria Rocco, pelas sugestões e leitura do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, M.L.; ROCCO, I.M.; FELIPPE, J.M.M.S. & CRUZ, A.S. - Growth and Maintenance of *Aedes albopictus* cell line, clone C6/36, in different media. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **53**:63-70,1993.
2. BHAMARAPRAVATI, N.; YOKSAN, S.; CHAYANIYAYOTHIN, T.; ANGSUBPHAKORN, S. & BUNYRATVEJ, A. - Immunization with a live attenuated dengue 2 virus candidate vaccine (16681-PDK53): Clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull. Wld Hlth Org.*, **65**: 189-195, 1987.
3. BIEDRZYCKA, A.; CAUCHI, M.R.; BARTHOLOMEUSZ, A.; GORMAN, J.J. & WRIGHT, P. J. - Characterization of protease cleavage sites involved in the formation of the envelope glycoprotein and three non-structural proteins of dengue virus type 2. New Guinea C strain. *J. Gen. Virol.*, **68**: 1317-1326, 1987.
4. BLITVICH, B.J.; MACKENZIE, J.S.; COELEN, R. J. ; HOWARD, M.J. & HALL, R.A. - A novel complex formed between the flavivirus E and NS1 proteins : analysis of its structure function. *Arch. Virol.*, **140**: 145-156, 1995.
5. BLOK, J. - Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J. Gen. Virol.*, **66**:1323-1325, 1985.
6. BLOK, J.; HENCHAL, E.A. & GORMAN, B.M. - Comparison of dengue viruses and some other flaviviruses by cDNA-RNA hybridization analysis and detection of a close relationship between dengue virus serotype 2 and Edge Hill virus. *J. Gen. Virol.*, **65**: 2173-2181, 1984.
7. BLOK, J.; SAMUEL, S.; GIBBS, A.J. & VITARANA, V.T. - Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequence of the envelope gene from eight dengue-2 viruses. *Arch. Virol.*, **105**:39-53, 1989.
8. BOONPUCKNAVIG, S.; VUTTIVIROJ, O. & BOONPUCKNAVIG, V. - Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, **75**: 647-653, 1981.
9. BRANDT, W.E.; CARDIFF, R. D. & RUSSELL, P.K. - Dengue virions and antigen in brain and serum of infected mice. *J. Virol.*, **6**:500-506, 1970a.
10. BRANDT, W.E.; CHIEWSILP, D.; HARRIS, D.L. & RUSSELL, P.K. - Partial purification and characterization of a dengue virus soluble comment fixing antigen. *J. Immunol.*, **105**:1565-1568, 1970b.
11. BRITON, M.A. - Replication of flavivirus. In : S. Schlesinger & M.J. Schlesinger, *Togaviridae and Flaviviridae*, New York : *Plenum*, 1986, 327-365.
12. BROWN, F.; ATHERTON, J. & KNUDSEN, D. - The Classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses un Sandai, September, 1984. *Intervirology*, **25**:141-143, 1986.
13. BURKE, D.S.; NISALAK, A. & JOHNSON, D.E. - A. prospective study of dengue infection in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **38**:172-180, 1988.
14. BUSBY, D.W.G.; HOUSE, W. & MacDONALD, J.R. - *Virological Technique. Ed. J. and A. Churchill LTD*, 1964: 1-9, Cap. 1.
15. CALISHER, C.H.; BRANDT, W.E.; CASALS, J.; SHOPE, R.E.; TESH, R.B. & WIEBE, M.E. - Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togaviridae, Alphaviridae. Intervirology*, **14**:229-232, 1980.
16. CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J.M.; SHOPE, R.E.; PORTERFIELD J.S. & BRANDT, W.E. - Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.*, **70**:37-43, 1989.
17. CARDIFF, R. D. & LUND, J.K. - Distribution of dengue-2 antigens by electron immunocytochemistry. *Infect. Immun.*, **3**:1699-1709, 1976.
18. CHAMBERLAIN, R.W. - Epidemiology of arthropod -borne togavirus: The role of arthropods as hosts and vectors and of vertebrate hosts in natural transmission cycles. In: R.W.Schlesinger Ed. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York; *Plenum*, 1980.
19. CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M. - Flavivirus genome organization expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**:649-688, 1990a.
20. CHAMBERS, T.J.; GRAKOU, A. & RICE, C.M. - Processing of the yellow fever virus non-structural polyproteins: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J. Virol.*, **65**:6042-6050, 1991.

21. CHAMBERS, T.J.; McCOURT, D.W. & RICE, C.M. - Production of yellow fever virus proteins in infected cells: Identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology*, **177**:159-174, 1990b.
22. CHAMBERS, T.J.; WEIR, R.C.; GRAKQUI, A.; McCOURT, D.W. & BAZAN, J.F. FLETTERICK, R.J. & RICE, C.M. - Evidence that the N-terminal domain of yellow fever virus NS3 is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:8898-8902, 1990c.
23. CHANDLER, L.J.; BLAIR, C.D. & BEATY, B.J. - Detection of Dengue-2 viral RNA by reversible target capture hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **31**:2641-2647, 1993.
24. CHAPPELL W.A., CALISHER C.H., TOOLE R.F., MANESS K.C., SASSO D.R. & HENDERSON B.E. - Comparison of three methods used to isolate Dengue virus type 2. *Appl. Microbiol.*, **22**: 1100-1103, 1971.
25. CHATURVEDI, U.C.; BHARGAVA, A. & MATHRUR, A. - A production of cytotoxic factor in the spleen of dengue virus-infected mice. *Immunology*, **40**:665-671, 1980.
26. CHOO, Q.L.; KUO, G. WEINER, A., OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W. & HOUGHTON, M. - Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**:359-362, 1989.
27. CHU, P.W. & WESTAWAY, E.G. Characterization of Kunjin virus RNA - polymerase: reinitiation of synthesis in vitro. *Virology*, **157**:330-337, 1987.
28. CHU, P.W.G. & WESTAWAY, E.G. - Replication strategy of Kunjin virus: Evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication, *Virology*, **140**:68-79, 1985.
29. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. & SIRINAVIN, S. - Antibodies Against Dengue viral proteins in primary and Secondary Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **44**:481-493, 1991.
30. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. & PINTHONG, C.; SIRINAVIN, S. & CHAIYOTHA, A. - Antibodies to dengue viral polypeptides. I. Sensitivity and specificity of the viral-antigen-strips/enzyme immunoassay. *South. Asian J. Trop. Med. Public Health*, **18**:362-372, 1987.
31. CLARKE, D.H. & CASALS, J. - Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**:551, 1958.
32. CLARKE, D.M.; LOO, T.W.; HUI, I.; CHONG, & GILLAM, S. - Nucleotide sequence and in vitro expression of rubella virus 24S subgenomic messenger RNA encoding the structural proteins E1, E2 and C. *Nucleic Acids Res.*, **15**:3041-3057, 1987.
33. CLEAVES, G.R. - Identification of dengue type 2 virus-specific high molecular weight proteins in virus-infected BHK cells. *J. Gen. Virol.*, **66**:2767-2771, 1985.
34. COHIN, S.N. & HALSTEAD, S.B. - Shock associated with dengue infection. The clinical and physiological manifestations of dengue hemorrhagic fever in Thailand. *J. Pediatr.*, **68**:448-456, 1966.
35. COIA, G., PARKER, M.D.; SPEIGHT, G.; BYRNE, M.E. & WESTAWAY, E.G. - Partial nucleotide sequence of the Murray Valley Encephalitis virus genome comparison of the encoded polypeptides with Yellow Fever virus structural and non-structural proteins. *J. Gen. Virol.*, **69**:1-21, 1988.
36. COLLETT, M.S.; ANDERSON, D.K. & RETZEL, E. - Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flavivirus. *J. Gen. Virol.*, **69**:2637-2643, 1988.
37. DeFOLIART, G.R.; GRIMSTAD, P.R. & WATTS, D.M. - Advances in mosquito-borne arbovirus/vector research. *Ann. Rev. Entomol.*, **32**:479-505, 1987.
38. DeGALLIER, N.; HERVÉ, J.P.; ROSA, A.P.A.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, J.F.S.T. & SA FILHO, G.C. - A Ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectivas. *Hiléia Médica*, **8**:1-98, 1987.
39. DeMADRID, A.T. & PORTERFIELD, J.S. - The flavivirus (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.*, **23**:91-96, 1974.
40. DEUBEL, V.; DIGOUTTE, J.P.; MONATH, T.P. & GIRARD, M. - Genetic heterogeneity of Yellow Fever virus strains from Africa and the Americas. *J. Gen. Virol.*, **67**:209-213, 1986.
41. DEUBEL, V.; KINNEY, R.M. & TRENT, D.W. - Nucleotide sequence and deduced amino acid

- sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology*, **165**:234-244, 1988.
42. ECKELS, K.H.; KLIKS, S.C.; DUBOIS, D.R.; WAHL, L.M. & BANCROFT, W.H. - The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue-2 live-virus vaccine. *J. Immunol.*, **135**: 4201-4203, 1985.
43. ECKELS, K.H., SCOTT, R.M.; BANCROFT, W.H.; BROWN, J.; DUBOIS, D.R.; SUMMERS, P.L.; RUSSEL, P.K. & HALSTEAD, S.B. - Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. V. Human response to immunization with a candidate strain prepared in fetal rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**:684-689, 1984.
44. ECKELS, K.H.; YONG-XIN, Y.; DUBOIS, D.R.; MARCHETTE, N.J.; TRENT, D.W. & JOHNSON A.J. - Japanese encephalitis virus live attenuated vaccine; Chinese strain SA 14-14-2; adaptation to primary canine kidney cell cultures preparation of a vaccine for human use. *Vaccine*, **6**:513-518-1988.
45. ELIOTT, R.M. & WILKIE, M.L. - Persistent infection of *Aedes albopictus* C6/36 cells by Bunyamwera virus *Virology*, **150**:21-32, 1986.
46. FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y.-M. & LAI, C.-J. - Both nonstructural proteins NS<sub>2</sub>B and NS<sub>3</sub> are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, **65**:2467-2475, 1991.
47. FAUGOUT, B.; CHANOCK, R. & LAI, C.-J. - Proper processing of dengue virus non-structural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream non-structural protein NS2A *J. Virol.*, **63**:1852-1860, 1989.
48. FEIGHNY, R.; BURROUS, J. & PUTNAK, R. - Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. *J. Trop. Med. Hyg.*, **50**:322-328, 1994.
49. FENNER, F. - Classification of viruses: why, when and how. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **52**:223-231, 1974.
50. FIGUEIREDO, L.T.M. - Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.*, **23**:13-18, 1990.
51. FU, J.; TAN, B.-H.; YAP, E.-H.; CHAN, Y.-C. & TAN, Y.H. - Full-length cDNA sequence of dengue type virus (Singapore strain 275/90). *Virology*, **188**: 953-958, 1992.
52. GALLER, R. - Molecular approach to the development of flavivirus vaccines. *Ciência e Cultura*, **45**:263-268, 1993.
53. GENTRY, M.K.; HENCHAL, E.A. McCOWN, J.M.; BRANDT, W.E. & DALRYMPLE, J.M. - Identification of determinants on dengue 2 virus using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**:548-555, 1982.
54. GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S. -Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. *J. Gen. Virol.* **66**: 1969-1982, 1985.
55. GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S. - pH-dependent fusion between the flavivirus West-Nile and liposomal model membrane. *J. Gen. Virol.*, **67**:157-166, 1986b.
56. GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S. - The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: Effects of pH and ammonium chloride. *J. Gen. Virol.*, **67**: 1941-1950, 1986a.
57. GORBALENYA, A. E.; DONCHENKO, A.P.; KOONIN, E.V. & BLINOV, V.M.N. -Terminal domains of putative helicases of flavi and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* **17**:3889-3897, 1989.
58. GRUN, J.B. & BRITON, M.A. - Characterization of West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferase in cell-free extracts. *J. Virol.* **60**: 1113-1124, 1986.
59. GUBLER, D.J. SATHER, G.E.; KUNO, G. & CABRAL, J. R., Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**:1280-1284, 1986.
60. GUBLER, D.J. - Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: The Americas. *Puerto Rico Health Sci. J.* **6**: 107-111, 1987.
61. GUBLER, D. J. - Dengue. In: Monath, T.P., ed. The arboviruses: ecology and epidemiology. Ed. T.P. Monath, vol II. Boca Raton, Fl: CRC Press: 1988, 223-260.

62. GUBLER, D.J. - Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Prospects for the year 2,000. In: *Dengue: A Worldwide Problem, a Common Strategy*. Ed. by S.B. Halstead & Gomes-Dantes, 1992. PG: 19-27.
63. GUBLER, D.J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M. & OLIVER, A. - Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for Dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**: 158-165, 1984.
64. GUIRAKHO, F.; BOLIN, R.A. & ROEHRIG, J.T. - The Murray Valley Encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitops within the 4 domain of E glycoprotein. *Virology*, **191**: 921-931, 1992.
65. GUIRAKHO, F.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.W.; HOLZMANN, H. & KUNZ, C. - Fusion activity of flavivirus: Comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne Encephalitis virions. *J.Gen. Virol.*, **72**: 1323-1329, 1991.
66. GUIRAKHO, F.; HEINZ, F.X.; & KUNZ, C. - Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occuring at acidic pH. *Virology*, **169**: 90-99, 1989.
67. GUIRAKHO, F.; BOLIN, R.A. & ROEHRIG, J.T. - The Murray Valley Encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology*, **191**:921-931,1992.
68. GUZMAN, M.G.; KOURI, G.P.; BRAVO, J.; CALUNGA, M.; SULER, M.; VASQUEZ, S.; SANTOS, M.; VILLASCUSO, R.; BASANTA, P.; INDAN, G. & BALLESTER, J.M. - Dengue haemorrhagic fever in Cuba: clinical investigation. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**:239-241,1984.
69. HAHN, Y.S.; GALLER, R.; HUNKAPILLER, T.; DALRYMPLE, J.M.; STRAUSS, J.H. & STRAUSS, E.G. - Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flavivirus. *Virology*, **162**: 167-180, 1988.
70. HALSTEAD, S.B.- Dengue haemorrhagic fever - a public health problem and a field for research. *Bull. WHO*, **58**: 1-21, 1980.
71. HALSTEAD, S.B. - Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*, **239**:476-481, 1988.
72. HALSTEAD, S.B.; MARCHETTE, N.J; DIWAN, A.R; PALUMBO, N.E. & PUTVATANA, R. & LARSEN, L.K. - Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in Primary Kidney Cells. III. Athibutis. Reversion to virulence by passage of cloned virus in fetal Rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**(4): 672-678, 1984.
73. HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S. & COHIN, S.N. - Observations related to pathogenesis of dengue haemorrhagic fever IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* **42**: 311-328, 1970.
74. HASE, T.; SUMMER, P.L. & ECKELS, K.H. - Flavivirus entry into cultured mosquitos cells and human peripheral blood monocytes. *Arch. Virol.*, **104**:129-143, 1989.
75. HEINZ, F.X. - Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Virus Res.*, **31**:103-168, 1986.
76. HEINZ, F.X.; STIASNY, K.; PÜSCHNER-AUER, G.; HOLZMANN, H; ALLISON, S.L.; MANDL, C.W.& KUNZ, C. - Structural changes and functional control of the Tick-Borne Encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*, **198**:109-117, 1994.
77. HENCHAL, E.A. & PUTNAK, A.R. - The dengue virus. *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**:376-396, 1990.
78. HENCHAL, E.A.; GENTRY, M. K.; McCOWN, J.M. & BRANDT, W.E. - Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J.Trop. Med. Hyg.*, **31**:830-836, 1982.
79. HENCHAL, E.A.; McCOWN, J.M.; BURKE, D.S.; SEGUIN, M.C. & BRANDT, W.E. -Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**: 162-167, 1985.
80. HENCHAL, E.A.; McCOWN, J.M.; SEGUIN, M.C.; GENTRY, M.K. & BRANDT, W.E. - Rapid identification of denque virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**:164-169, 1983.
81. HENCHAL, E.A.; POLO, S.L; VOMDAM, V; YAAEMSERI, C; INNIS, B.L.&HOKE, C.H. - Sensitivity and specificity of a universal primer set for rapid diagnosis of dengue virus

- infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**:418-428, 1991.
82. HENCHAL, J.M.; REPIK, P.M.; McCOWN, J.M. & BRANDT, W.E. - Identification of an antigenic and genetic variant of dengue - 4 virus from the Caribbean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**:401-407, 1986.
83. IGARASHI, A. - Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, **40**:531-544, 1978.
84. IRIE, K.; SASAGURI, Y.; PUTNAK, R. & PADMANABHAN, R. - Sequence analysis of clone dengue virus type 2 genome (New Guinea - C strain) *Gene*, **75**: 197-211, 1989.
85. ISHAK, R.; TOVEY, D.G. & HOWARD, C.R. - Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J. Gen. Virol.*, **69**:325-335, 1988.
86. KARABATSOS, N. - General characteristics and antigenic relationships. In: St. Louis Encephalitis. Washington D.C.: *Am. Public Health Assoc.*: 105-158, 1980.
87. KARABATSOS, N. - Internacional Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3<sup>a</sup>. ed. San Antonio, Tex: *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, P. 1147, 1985.
88. KAUFMAN, B.M.; SUMMERS, P.L.; DUBOIS, D.R. & ECKELS, K.H. - Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E - glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, **36**:427-434, 1987.
89. KHANNA, M. CHATURVEDI, U.C.; SHARMA, M. S.; PANDEY, V.C. & MATHUR, A. - Increased capillary permeability mediated by a dengue virus- induced lymphokine. *Immunology*, **69**: 449-453, 1990.
90. KILLEN, H. & O'SULLIVAN, M.A. - Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J. Virol. Med.*, **41**: 135. 146, 1993.
91. KIMURA, T. & OHYAMA, A. - Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane protein. *J. Gen. Virol.*, **69**:1247-1254, 1988.
92. KONISHI, E.; PINCUS, S.; FONSECA, B.A.L.; SHOPE, R.E.; PAOLLET, E. & MARSON, P.W. - Comparison of protective immunity by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology*, **185**:401-410, 1991.
93. KRISHNAMURTI, C.; WAHL, L.M. & ALVING, B.M. Stimulation of plasminogen activator inhibitor activity in human monocytes infected with dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**:102-107, 1989.
94. KUBERSKI, T.T. & ROSEN, L. - A simple method for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **26**:533-537, 1977.
95. KUNO, G.; GUBLER, D. J.; VELEZ, M. & OLIVRE, A. - Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of Dengue viroses. *Bull. World Health Organ.*, **63**:279-286, 1985.
96. KUNO, G. - Cultivation of mosquito cell lines in serum-free medium and their effects on Dengue virus replication. *In Vitro*, **19**: 707-713, 1983.
97. KUNO, G. - Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grow in serum-free medium. *J. Clin. Microbiol.*, **16**:851-855, 1982.
98. KUNO, G.; GÓMEZ, I. & GUBLER, D.J. - Detecting artificial anti-dengue IgM Immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Trop. Med. Hyg.*, **36**:153-159, 1987.
99. KURANE, I. & ENNIS, F.A. - Induction of interferon alfa from human lymphocytes by autologous, dengue virus-infected monocytes. *J. Exp. Med.*, **166**: 999-1008, 1987.
100. KURANE, I.; INNIS, B.L.; NISALAK, A.; HOKE, C.; NIMAMITYA, S.; MEAGER, A. & ENNIS, F.A. - Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gama production. *J. Clin. Invest.*, **83**:506-513, 1989.
101. LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J. & VORNDAM, A.V. - Rapid detection and typing of dengue viruses clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **3**:545-551, 1992.
102. LEE, E.; FERNON, C.; SIMPSON, R.; WEIR, R.C.; RICE, C.M. & DALGARNO, I. - Sequence of the 3' half of the Murray Valley encephalitis virus genome and mapping of the nonstructural proteins NS1 and NS5. *Virus Genes*, **4**:197-213, 1990.

103. LOBIGS, M.; MARSHALL, I.D.; WEIR, R.C. & DALGARMO, L. - Genetic differentiation of Murray Valley encephalitis in Australia and Papua New Guinea. *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **64**:571-585, 1986.
104. LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.M.; SACCHETTA, L.A.; & CALISHER, C.H. - Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of etiologic agent. Rocio virus. *Am. J. Epidemiol.*, **108**:444-449, 1978.
105. MACKOW, E.; MAKINO, Y. ZHAO, B.; ZHANG, Y.M.; MARKOFF, L.; BUCKLER-WHITE, A.; GULLER, M.; CHANOCK, R. & LAI, C.J. - The nucleotide sequence of dengue type 4 virus; analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology*, **159**:217-228, 1987.
106. MANDL, C.W.; HEINZ, F.X.; STÖCKL, E. & KUNZ, C. - Genome sequence of Tick-Borne Encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other Flaviviruses. *Virology*, **173**:291-301, 1989.
107. MARKOFF, L. - In vitro processing of dengue virus structural proteins: cleavage of the pre-membrane protein. *J. Virol.*, **63**:3345-3352, 1989.
108. MARPHY, F.A. - Togavirus morphology and morphogenesis. In: *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*: 241-316, New York Academic, 1980.
109. MASON, P.W.; ZUGEL, M.U.; SEMPRONI, A.R.; FOURNIER, M.J. & MASON, T.L. - The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS<sub>1</sub> proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.*, **71**:2107-2114, 1990.
110. MATHEWS, R.E. - Classification and nomenclature of viruses (Third Report of the ICTV). *Intervirology*, **12**:132-296, 1979.
111. MEGRET, F.; HUGNOT, J.P.; FALCONAR, A.; GENTRY, M.K.; MORENS, D.M.; MURRAY, J.M.; SCHLESINGER, J.J.; WRIGHT, P.J.; YOUNG, P.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. & DEUBEL, V. - Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology*, **187**:480-491, 1992.
112. MONATH, T.P. - Flaviviruses. In: (FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M.) 2<sup>nd</sup> ed. *Virology*. New York: Raven Press, cap. 27, pg. 763-814, 1990.
113. MORENS, D.M.; MARCHETT, N.J.; CHU, M.C. & HALSTEAD, S.B. - Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**:644-651, 1991.
114. MORITA, K.; MAEMOTO, T.; HONDA, S.; ONISHI, K.; MURATA, M.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. - Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **44**:54-58, 1994.
115. MORITA, K.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. - Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**:2107-2110, 1991.
116. MURRAY, J.M.; AASKOW, J.G. & WRIGHT, P.J. - Processing of the Dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J. Gen. Virol.*, **74**:175-182, 1993.
117. MUSSGAY, M.; ENZMANN, P.J.; HORZINEK, M.C. & WEILAND, E. - Growth cycles of arbovirus in vertebrate and arthropod cells. *Prog. Med. Virol.*, **19**:258-323, 1975.
118. NG, M.L. & LAU, L.C. - Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. *Arch. Virol.*, **100**:199-211, 1988.
119. NIMMANNITYA, A.; HALSTEAD, S.B.; COHEN, & MARGIOTTA, M.R. - Dengue and chikungunya virus infections in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **18**:954-971, 1969.
120. NOWAK, T. & WENGLER, G. - Analysis of disulphides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology*, **156**:127-137, 1987.
121. NOWAK, T., FARBER, P.M.; WENGLER, G. & WENGLER, G. - Analysis of the terminal sequences of West Nile structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal for a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology*, **168**:365-376, 1989.
122. OLSON, K.; BLAIR, C.; PADMANABHAN, R. & BEATY, B. - Detection of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* by nucleic acid hybridization with strand-specific RNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, **26**:579-581, 1988.

123. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). - Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: *Guidelines for prevention and control*. Washington, D.C.: PAHO, 1994.
124. OSATOMI, K. & SUMIYOSHI, H. - Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*, **176**:643-647, 1990.
125. PINHEIRO, F.P. - Situação das arboviroses na região amazônica. In: International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fever. Belém. 1980. Rio de Janeiro. *Academia Brasileira de Ciências*: 27-48, 1982.
126. PLETNEV, A.G.; YAMSHCHIKOV, V.F. & BLINOV, V.M. - Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the tick-borne encephalitis virus. *Virology*, **174**:250-263, 1990.
127. PREUGSCHAT, F. & STRAUSS, J.H. - Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of Dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology*, **185**: 689-697, 1991.
128. PREUGSCHAT, F.; YAO, C.W. & STRAUSS, J.H. - In vitro processing of dengue 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B and NS3. *J. Virol.*, **64**:4364-4374, 1990.
129. PRYOR, M.J. & WRIGHT, P.J. - Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J.Gen. Virol.*, **75**:1183-1187, 1994.
130. RACE, M.; WILLIAMS, M.C. & AGOSTINI, C.F. - Dengue in the Caribbean : virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**:18-22, 1979.
131. RANDOLPH, V.B. & STOLLAR, V. - Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J. Gen. Virol.*, **71**:1845-1850, 1990.
132. RANDOLPH, V.B.; WINKLER, G. & STOLLAR, V. - Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*, **174**:450-458, 1990.
133. REHLE, T.M. - Classification, distribution and importance of arboviruses. *Trop. Med. Parasit.*, **40**:391-399, 1989.
134. REPIK, P.M.; DALRYMPLE, J.M.; BRANDT, W.E.; McCOWN, J.M. & RUSSELL, P.K. - RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am.J.Trop. Med. Hyg.*, **32**:577-589, 1983.
135. RICE, C.; LENCHES, E.M.; EDDY, S.R.; SHIN, S.J.; SHEETS, R.L. & STRAUSS, J.H. - Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, **229**:726-733, 1985.
136. RICE, C. M. & STRAUSS, J.H. - Production of flavivirus polypeptides crossing. *Sem.Virol.*, **1**:357-367, 1990.
137. RICE, C. M.; STRAUSS, E.G. & STRAUSS, J.H. - Structure of flavivirus genome. In: S.Schlesinger & M.J. Schlesinger. *Togaviridae and Flaviviridae*. New York: *Plenum*, 1986, 279-326.
138. ROEHRIG, J.T.; HUNT, A.R.; JOHNSON, A.J. & HAWKES, R.A. - Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology*, **171**: 49-60, 1989.
139. ROEHRIG, J.T.; JOHNSON, A.J. HUNT, A.R.; BOLIN, R.A. & CHU, M.C. - Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology*, **177**:668-675, 1990.
140. ROEHRIG, J.T.; MATHEWS, J.H. & TRENT, D.W. - Identification of epitopes on the E glycoprotein of St. Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Virology*, **128**:118, 1983.
141. ROSEN, L. & GUBLER, D.J. - Use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **23**:1153, 1974.
142. ROSEN, L. - Observations on the epidemiology of dengue in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**:45-58, 1958.
143. ROSEN, L. - The Emperor's new colthes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J.Trop. Med. Hyg.*, **26**:337-343, 1987.
144. RUIZ-LINARES, A.; BOULOY, M.; GIRARD, M. & CAHOUR, A. - Modulations of the in vitro translational efficiencies of Yellow Fever virus mRNAs: Interactions between coding and noncoding regions. *Nucleic Acids Res.*, **17**:2463-2474, 1989.
145. RUSSELL, P.K. & McCOWN, J.M. - Comparison of dengue 2 and dengue 3 virus strains by neutralization test and identification of a subtype of dengue 3. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **21**:21-99, 1972.

146. RUSSELL, P.K. & NISALAK, A. - Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J. Immunol.*, **99**:291-296, 1967.
147. SABIN, A.B. & SCHLESINGER, R.W. - Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice *Science*, **101**:640-642, 1945.
148. SABIN, A.B. - Research on dengue during world war II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1**:30-50, 1952.
149. SANGKHAWIBHA, N.; ROJANASUPHOT, S.; AHANDRIK, S. VIRIYAPONGSE, S.; JATANASEN, S.; SALITUH, V.; PANTHUMACHINDA, B. & HALSTEAD, S.B. - Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiological study in Rayong, Thailand. *Am. J. Epidemiol.*, **120**:653-669, 1984.(28)
150. SCHLESINGER, J.J.; BRANDRISS, M.W. & WALSH, E.E. - Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J.Gen. Virol.*, **68**: 853-857, 1987.
151. SCHRADER, A. P. & WESTAWAY, E.G. Translation mapping with flavivirus Kunjin: Gene order and anomalies in translation of NS5. *Virus Res.*, **9**:323-334, 1988.
152. SHOPE, R.E. & SATHER, G.E. - Arboviruses. In: Diagnostic for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections. F.H.Lennette & N.J. Schmidt. 2nd edition, American Public Health Association. Washington, p. 767-814. 1979.
153. SILER, J.F.; HALL, M.W. & KITCHENS, A.P. - Dengue its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J. Sci.* 29:1-304, 1926. Apud Fields, B.N.; Knipe, D.M. et alii. *Virology*. 2<sup>a</sup> ed. New York, Raven Press, cap. 27, 789-790, 1990.
154. SIMMONS, J.S.; ST. JOHN, J.H. & REYNOLDS, F.H.K. - Experimental studies of dengue. *Philippine J. Sci.* 44:1-251, 1931. Apud Fields, B.N.; Knipe, D.M. et. alii. *Virology*. 2<sup>a</sup> ed. New York, Raven Press, cap. 27,789-790, 1990.
155. SINARACHATANANT, P. & OLSON, L.C. - Replication of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* cell cultures. *J.Virol.*, **12**:275-283, 1973.
156. SINGH, K.R. - Propagation of arbovirus in Singh's cell lines.I. Growth of arboviruses in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* cell lines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **55**:127-133, 1971.
157. SINGH, K.R.P. & PAUL. S.D. - Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cell culture. *Bull World Health Organ.*, **40**:982-983, 1969.
158. SINGH, K.R.P. - Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L). *Current Sci.*, **36**:506-508, 1967.
159. SMITH, G.W. & WHIGHT, P.J. - Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. *J. Gen. Virol.*, **66**:559-571, 1985.
160. SPEIGHT, G. & WESTAWAY, E.G. - Positive identification of NS4A, the last of the hypothetical nonstructural proteins of flaviviruses. *Virology*, **170**:299-301, 1989.
161. SPEIGHT, G.; COIA, G. PARKER, M.D. & WESTAWAY, E.G. - Gene mapping and positive identification of the nonstructural proteins NS2A, NS2B, NS3, NS4A, and NS5 of the flavivirus Kunjin and their cleavage sites. *J. Gen. Virol.*, **69**:23-34, 1988.
162. STEPHERSON, J.R. - Flavivirus vaccines, **6**:471-480, 1988.
163. SUITOR, E.C.; JUN & PAUL, F.J. - Syncytia formation of mosquito cell cultures mediated by type 2 dengue virus. *Virology*, **38**:482-485. 1969.
164. SUMIYOSHI, H.; MORI, C. ; FUKU, I.; MORITA, K. KUHARA, S.; KONDOU, J.; KIKUCHI, Y.;NAGAMATU, H. & IGARASHI, A. - Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA *Virology*, **161**:497-510, 1987.
165. SUMMERS, P.L.; HOUSTON, C.W.; RUIZ.M.M.; HASE,T. & ECKELS, K.H. - Flavivirus can mediate fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures. *Virus Res.*, **12**:383-392, 1989.
166. TANAKA, H. - Rocio: Evolução cronológica da interação vírus-célula pela análise morfológica em Microscopia Eletrônica. *Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia)*, 1987.
167. TESH, R.B. - A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**:1053-1059, 1979.
168. TRENT, D.W. & NAEVE, C.W. - Biochemistry and replication. In: St. Louis Encephalitis. T.P. Monath. Washington D.C.: *Am. Public Health Assoc.*: 159-199, 1980.

169. TRENT, D.W. - Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. *J. Virol.*, **22**:408, 1977.
170. TRENT, D.W.; GRANT, J.A.; MONATH, T.P.; MANSKE, C.L.; CORINA, M. & FOX, G.E. - Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus in Southeast Asia. *Virology*, **172**: 523-535, 1989.
171. TRENT, D.W.; GRANT, J.A.; ROSEN, L. & MONATH, T.P. - Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*, **128**:271-284, 1983.
172. TRENT, D.W.; GRANT, J.A.; VORNDAM, A.V. & MONATH, T.P. - Genetic heterogeneity among Saint Louis encephalitis virus isolates of different geographic origin. *Virology*, **114**:319-332, 1981.
173. TRENT, D.W.; KINNEY, R.M.; JOHNSON, B.J. VORNDAM, A.V.; GRANT, J.A. - Partial nucleotide sequence of St. Louis encephalitis virus RNA : structural proteins, NS1, NS2A, and NS2B. *Virology*, **156**:293-304, 1987.
174. TRENT, D.W.; MANSKE, C.L.; FOX, G.E.; CHU, N.C. KLINKS, S.C.; MONATH, T.P. - The Molecular Epidemiology of Dengue Viruses: Genetic variation and microevolution. *Appl. Virol. Res.*, **2**:293-315, 1990.
175. VARMA, M.G.R.; PUDNEY, C.L.; FOX, G.E.; CHU, N.C.; KLIKS, S.C. & MONATH, T.P. - *Malayensis colless*, and *Aedes pseudoscutellaris* (theobald) and their infection with some arboviruses. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**:374, 1974.
176. VENUGOPAL, K. & GOULD, E.A. - Towards a new generation of flavivirus vaccines. *Vaccine*, **12**:966-975, 1994.
177. VEZZA A.C., ROSEN L., REPIK, P., DALRYMPLE, J. & BISSHOP D.H.L. - Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**:643-652, 1980.
178. WENGLER, G. & WENGLER, G. -Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+ pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J. Virol.*, **63**: 2521-2526, 1989.
179. WESTAWAY, E.G. - Flavivirus replication strategy. *Adv. Virus Res.*, **33**:45-90 1987.
180. WESTAWAY, E.G. - Replication of Flavivirus. In: The Togaviruses: Biology, Structure, Replication. New York: *Academic Press.*, 531-581, 1980.
181. WESTAWAY, E.G.; BRITON, M.A.; GAIDAMOVICH, S.; HORZINEK, M.C.; IGARASHI, A; KAARAINEN, L.; LVOV, D.K.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSELL, P.K. & TRENT, D.W. - Flaviviridae. *Intervirology*, **24**:183-192-1985.
182. WINKLER, G.; RANDOLPH, V.B.; CLEAVES, G.R.; RYAN, T.E. & STOLLAR, V. -Evidence that the mature form of flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*, **162**:187-196, 1988.
183. WRIGHT, P.J.; CAUCHI, M.R. & NG, M.L. - Definition of the carboxyl termini of the three glycoproteins specified by Dengue virus type 2. *Virology*, **1989**:61-67, 1989.
184. YAMSHCHIKOV, V.F. & COMPANS, R.W. - Formation of the flavivirus envelope: Role of the viral NS2B-NS3 protease. *J. Virol.*, **69**:1995-2003, 1995.
185. YAMSHCHIKOV, V.F. & COMPANS, R.W. - Regulation of late events in flavivirus polyproteins processing and maturation. *Virology*, **192**: 38-51, 1993.
186. ZHAO, B.; MACKOW, E.; BUCKLER-WHITE, A. MARKOFF, L. CHANOCK, R.M.; LAI, C.J. & MAKINO, Y. - Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequence: analysis of genes coding for structural proteins. *Virology*, **155**: 77-88, 1986.

Recebido para publicação em 7/3/96

## FENILCETONÚRIA

Heidi Pinto MARTINS  
Pesquisadora Científica da Seção de Imunologia  
do Instituto Adolfo Lutz\*

RIALA6/794

MARTINS, H.P. - Fenilcetonúria Phenylketonuria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):47-52, 1996.

**RESUMO:** O interesse pelas doenças genéticas têm aumentado nos países de primeiro mundo à medida que o controle das doenças infecciosas e sociais torna-se cada vez mais efetivo. Dados recentes<sup>(2)</sup> mostram que cerca de 50% das mortes perinatais ocorrem por causas genéticas. Além disso, 1/3 das internações de crianças em hospitais pediátricos e 10% das doenças crônicas de adultos também são atribuídas a fatores genéticos.

Estima-se que temos cerca de 50.000 a 100.000 genes, dispersos ao longo de 23 pares de cromossomos, responsáveis por nossas características hereditárias. Por outro lado, já são conhecidas cerca de 6000 doenças genéticas, a maioria ainda sem tratamento específico<sup>(1)</sup>. O grande desafio dos geneticistas tem sido o de identificar os nossos genes, compreender quais são os mecanismos que causam patologias genéticas, e enquanto não houver tratamentos eficazes, prevenir o nascimento de novos afetados.

Aminoacidopatias e organopatias são os erros inatos do metabolismo, mais comuns, do período neonatal<sup>(3)</sup>. Na Alemanha, aproximadamente 1:15000 dos recém-nascidos são diagnosticados como portadores de aminoacidopatias e aproximadamente 1:9000 são diagnosticados como portadores de organoacidopatias<sup>(1)</sup>. Especialmente no caso das organoacidopatias há evidências substanciais que este número deve estar subestimado.

**UNITERMOS:** Doenças genéticas - Aminoacidopatias - Hiperfenilalaninemia

### INTRODUÇÃO

A maioria das aminoacidopatias são autossômicas recessivas e enquanto não houver tratamento para as doenças genéticas, a prevenção de novos casos, através da identificação de portadores de genes patológicos é de importância fundamental. Entretanto, existem duas situações bastante distintas: a) os portadores clinicamente normais, porém, com risco de virem a ter filhos ou descendentes afetados e; b) os portadores já afetados<sup>(3,9,22)</sup>.

As novas técnicas de biologia molecular têm permitido avanços na identificação de portadores assintomáticos, através da localização e caracterização de genes patológicos.

Muitos casos de amino e organoacidopatias não são comumente diagnosticados, e a incidência destes distúrbios, pela sua complexidade e investimentos são muitas vezes proibitivos. Investigadores especializados estudaram crianças que desenvolveram sintomas indicativos de um erro inato do metabolismo e este procedimento foi denominado "screening" (varredura) seletivo<sup>(2)</sup>.

Uma doença genética, relativamente comum, onde se tem heterogeneidade intragênica é a fibrose cística (FC)<sup>(10)</sup> ou mucoviscidose. Embora seja a doença genética mais freqüente na população caucasóide dos Estados Unidos e Europa (incidência de 1 entre 1600-2000 nascimentos), é pouco conhecida entre nós. O quadro clínico caracteriza-se pela obstrução das vias

\*Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar - SP - CEP 01246-902.

respiratórias por um muco espesso, infecções respiratórias (principalmente por pseudomonas) e pneumonias recorrentes. Ocorre também envolvimento do trato intestinal, em cerca de 85% dos casos, que leva à insuficiência pancreática. Se estes sintomas não forem tratados precocemente o óbito ocorre ainda na primeira infância. O gene responsável pela FC, localizado no cromossomo 7, foi clonado em 1989<sup>(10)</sup> e descobriu-se que a mutação mais freqüente (cerca de 70% dos casos) era a deleção de um trinucleotídeo (F508) que leva à perda do aminoácido fenilalanina (no codon 508). A proteína codificada por este gene foi denominada CFTR ("cystic fibrosis transmembrane conductance regularor"). Apesar de sua função ainda ser discutida, uma das mais prováveis, embora não única, seria a de um canal endógeno de cloro<sup>(10)</sup>. Estudos realizados nos últimos dois anos, têm mostrado que existem mais de 200 mutações diferentes no gene da FC que podem causar desde um fenótipo grave até um quadro muito leve ou mesmo subclínico<sup>(11)</sup>.

Os aminoácidos são excretados pelos glomérulos e facilmente reabsorvidos pelos túbulos renais. Os aminoácidos que normalmente são encontrados na urina em grandes quantidades (25-200 mg/24horas) são: glicina, taurina, histidina e glutamina. Outros aminoácidos que ocorrem em muito menor quantidade (0-25 mg/24 horas) são: serina, leucina, cistina, arginina e fenilalanina<sup>(12,13)</sup>.

A fenilcetonúria (PKU) é o modelo mais bem conhecido de um erro inato do metabolismo com oligofrenia. A herança é autossômica recessiva, e a freqüência na Europa é de 1:6000 - 1:15000. Os pacientes nascem normais, mas progridem rapidamente para um quadro de retardo mental grave, se não forem tratados desde a mais tenra infância, porque a fenilalanina não pode se converter em tirosina<sup>(16,17,18)</sup>.

L-Fenilalanina → L-Tirosina → L-DOPA-Adrenafina

↓

Tiroxina (3,5-3',5'-tetraiodotironina)

Uma grande população tem sido estudada, nos últimos 35 anos, através da gota de sangue e em alguns países todas as crianças são abrangidas pelo deste teste. Constatou-se que nem todos os recém-nascidos com hiperfenilalaninemia (H.P.A.) apresentam a PKU clássica, mas há diversas formas de HPA atípicas<sup>(13)</sup> que precisam ser diferenciadas na forma de prognose e indicação do tratamento. Uma das formas mais interessantes de HPA é devida a deficiência de BH4 (tetrahydrobiopterina)<sup>(14)</sup>. O tratamento de PKU foi primeiro publicado em 1954<sup>(5)</sup> se res-

tringindo a uma dieta sem fenilalanina, para reduzir os níveis sanguíneos e então evitar danos cerebrais. Isto só pode ser sucesso se a terapia se iniciar nos dois primeiros meses de vida e se for cuidadosamente monitorada.

Além disso, a importância da tecnologia com DNA deverá ser empregada, no futuro, para diagnóstico diferencial, pré-natal e detecção heterozigota do PKU<sup>(9)</sup>. O local dos fragmentos de restrição de 68 alelos normais e 74 mutantes para fenilalanina hidroxilase (P.A.H.) foram determinados em 37 crianças francesas. Um total de 23 haplotipos, incluindo 18 alelos normais e 16 alelos mutantes foram observados; 2/3 de todos os alelos mutantes foram confinados dentro de somente 4 haplotipos, enquanto o restante 1/3 foi encontrado em 12 haplotipos, incluindo 8 haplotipos que até hoje se pensava estarem ausentes nos Caucásianos. Diversos haplotipos mutantes estavam presentes somente em variantes típicas, outros estavam só nas variantes mais fracas e alguns estavam presentes em ambas as variantes. Um haplotipo mutante (haplotipo 2) foi encontrado em diferentes mutações em outras séries, resultando ou em PKU típica ou hiperfenilalaninemia fraca. A combinação diplóide encontrada em alguns pacientes está associada com a composição heterozigota das mutações no local do PAH, principalmente no sul da Europa<sup>(11,11)</sup>.

Iniciadores específicos para doenças infecciosas mais comuns já foram descritos e testes diagnósticos desenvolvidos através de PCR. O grande valor da PCR é que ela detecta a presença da substância pesquisada e não as mudanças causadas pelo organismo, como no caso do imunodiagnóstico.

Podemos considerar cinco problemas metabólicos principais como responsáveis por causar hiperfenilalaninemia. A forma clássica é causada por um defeito na apoenzima fenilalanina-4-hidroxilase<sup>(3)</sup>. As outras 4 formas variantes são causadas pela deficiência do cofator tetrahydrobiopterina<sup>(4)</sup>. Os pacientes sofrem de uma deficiência de GPT ciclohidrolase I ou 6-pirovoil tetrahydropterina sintase, enzimas envolvidas na biossíntese do cofator tetrabiopterina (BH4), ou de uma deficiência de dihydropterina reductase, uma enzima envolvida na regeneração do cofator. Recentemente, uma nova variante com excreção de 7-iso-biopterina foi detectada<sup>(14,15)</sup>.

Pterinas são compostos obtidos das purinas. O primeiro estudo foi realizado por Hopkins, em 1889, na determinação da natureza dos pigmentos das asas das borboletas tendo sido encaixada como derivado do ácido úrico. Quarenta anos mais tarde, Wieland e Purmann demonstraram que os pigmentos amarelos não eram derivados da purina, mas de um novo grupo de substância, as pterinas, denominadas agora de xanto-pterinas.

Em 1945, Gates e Albert descobriram que o ácido

fólico continha um composto da mesma estrutura básica, conhecido como ácido pteroil L-glutâmico<sup>(3,4)</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) *Experiência Brasileira*

A fenilcetonúria foi descrita pela primeira vez por Folling, em 1934. No Brasil, especificamente em São Paulo, a triagem para PKU é realizada pela APAE desde 1975, que utiliza o método espectrofluorimétrico em "auto-analyzer" para sua detecção<sup>(16)</sup>.

Entre junho de 1976 e julho de 1988 foram analisados sangues de 1.888.799 recém-nascidos e foram detectados 144 casos de fenilcetonúria. Destes, 69 casos eram de PKU clássica e 66 casos de PKU transitória. Oitenta destas crianças (39 meninos e 41 meninas) pertencentes a 63 famílias diferentes foram selecionadas para uma avaliação regular. Os problemas operacionais foram muito grandes, necessitando de pessoal altamente treinado, pois a coleta que aparentemente parece ser simples é a base de toda a análise. O método é o clássico utilizado pelo Dr. Horst Bickel<sup>(5)</sup> da Univ. Children's Hospital 6900, Heidelberg, Alemanha, possuindo uma triagem que envolve a recepção das amostras com numeração em código por computadores, separação em duplicatas através de cortes na mancha de sangue com aparelho de perfuração<sup>(18)</sup>, adaptado ao próprio laboratório, arquivos especiais para guardar as duplicatas das amostras e finalmente o envio dessas amostras, com códigos diferentes, em dias alternados para os laboratórios.

Dezessete crianças foram diagnosticadas precocemente (0 a 3 meses) e 58 crianças só tardiamente. Em 3 casos dos diagnosticados precocemente a dieta não foi adequada (17,6%) e junto com os 58 tardiamente diagnosticados, causaram um retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.

A média do quociente de desenvolvimento (DQ) foi 85 para as crianças precocemente diagnosticadas e 46 naquelas tardiamente diagnosticadas. A média do quociente de inteligência (IQ) foi 91,5 nos precocemente diagnosticados e 63,5 naqueles tardiamente diagnosticados. De acordo com a idade do diagnóstico do PKU, o retardo mental foi observado em:

- 1:5 das crianças diagnosticadas entre 3 e 6 meses;
- 5:8 das crianças diagnosticadas entre 6 e 12 meses;
- 7:10 das crianças diagnosticadas após os 18 meses;
- 38:40 das crianças diagnosticadas após os 18 meses de idade.

Apesar de todas as 63 famílias terem participado de aconselhamento genético, 9(14%) tiveram outras crianças, das quais: 4 normais, 4 com PKU grave e 1 com PKU transitória. Estes resultados reforçam a importância de um seguimento multidisciplinar nos pacientes com PKU e o valor da introdução de uma dieta pobre em fenilalanina na idade do diagnóstico.

Um estudo semelhante foi efetuado na Índia, com 1314 crianças com retardo mental (MR), precisamente em Bangalore, Bombay, Delhi e Lucknow para determinar a extensão e os padrões genéticos causadores do retardo mental. De todos, 42,3% dos pacientes apresentaram retardo mental fraco; 25,3% moderado; 19,2% grave e 13,1% profundo. Entre os 1314 pacientes foram detectados 23,7% de anomalias cromossômicas; 5% tinham defeitos metabólicos e 11,6% apresentaram uma síndrome genética identificável. No restante 59,7% dos pacientes nenhuma causa genética conhecida foi identificada. Contudo, 66,5% destes pacientes tinham uma ou mais das seguintes condições:

- a) má formação congênita com ou sem "deficit" neurológico;
- b) história de consaguinidade;
- c) história familiar positiva;
- d) um teste positivo, mas sem um diagnóstico confirmado de defeito metabólico (sugerindo que não poderia ser identificada a causa genética).

### 2) *Coleta das amostras de sangue*

Desde 1960, os programas de seleção de neonatos utilizam o sangue seco colhido em papel de filtro<sup>(13,17,18)</sup>. Estas amostras de sangue devem ser colhidas por punção do calcanhar de todos os recém-nascidos após o segundo dia do nascimento, em papel de filtro especial (tipo Mohry & Nagel, n. 818) e enviados pela maternidade e de bebês maiores até cerca de 1 mês de vida enviadas pelas unidades de saúde.

### 3) *Ensaios*

3.1) *Teste de Guthrie*<sup>(18)</sup>. A germinação de esporos do *Bacillus subtilis* é acentuada na presença de fenilalanina, mesmo num meio contendo um inibidor para germinação de esporos. Uma gota de sangue colhida de punção do calcanhar de crianças é coletada em papel de filtro e colocada em meio especial. A área de crescimento bacteriano ao redor do disco de sangue é comparada com áreas de crescimento de discos contendo quantidades conhecidas de fenilalanina.

3.2) *Ensaio espectrofluorimétrico*<sup>(19)</sup>. O ensaio se baseia no método de McCaman e Robins de 1962<sup>(9)</sup>, modificado por Hill et alii em 1965<sup>(20)</sup>, utilizando a pro-

priedade do aumento da fluorescência do complexo fenilalanina-ninhidrina-cobre em presença de um peptídeo como a leucilalanina. Atualmente este método substitui o teste de Guthrie que pode produzir falsos positivos.

3.3) *Ensaio imonofluorimétrico (IFMA)*<sup>(6)</sup>. O princípio da técnica por IFMA foi publicado para o ensaio da gonadotrofina coriônica<sup>(7,8)</sup>. O fluorômetro usado foi o Arais 1230 (LKB-Wallac). A fonte de luz é uma lâmpada de Xenônio e dá 1000 flashes por segundo. A fluorescência é medida em ciclos de excitação, com um tempo de decaimento de 400 us e um período de contagem de 400 us. O número de fótons registrados durante 1000 ciclos é expresso como contagem por segundo. A medida por IFMA discrimina a radiação de fundo fluorescente (1-20ns) produzida pelo quelato de Europeum<sup>(9)</sup>.

#### 4) Resultados

Tanto o método espectrofluorimétrico como o fluorimétrico devem ser ligados a um terminal de computador para ser possível o fornecimento dos resultados, bem como o arquivamento. Tudo deve ser feito em absoluto sigilo e os resultados negativos devem ser encaminhados aos lugares de origem e os positivos devem ser novamente processados. Agora são necessárias as amostras arquivadas que deverão ser ensaiadas em duplicata. Caso haja a confirmação do resultado positivo estes devem ser entregues às assistentes sociais para que se localize a criança e sua família. Entra agora uma equipe multidisciplinar que deverá acompanhar o tratamento (dieta)<sup>(13)</sup>.

#### 5) Tratamento

O primeiro trabalho foi publicado em 1954<sup>(5)</sup> e dava ênfase a uma dieta restrita em fenilalanina (phe) para reduzir os níveis séricos e evitar o retardo mental. Este tratamento tem sucesso se iniciado nos dois primeiros meses de vida.

Atualmente, a tecnologia com DNA<sup>(11,12,15)</sup> vem sendo apontada como diagnóstico diferencial, diagnóstico pré-natal e detecção heterozigota do PKU.

#### 6) Problemas Operacionais

6.1) *Coleta das amostras*. As amostras devem ser colhidas em papel de filtro especial, secas, numeradas em código, acondicionadas e enviadas rapidamente ao centro de triagem<sup>(1,2)</sup>.

6.2) *Triagem Laboratorial*. Ao receber as amostras de sangue seco em papel de filtro, o laboratório deverá efetuar os cortes em duplicatas de discos de 3mm de diâmetro, contendo cerca de 2,9 ul de sangue; numerá-las em código fornecido pelo compu-

tador, armazenar ou arquivar uma das duplicatas rapidamente e outra, com a amostra, enviada para o laboratório<sup>(1,2)</sup>.

6.3) *Eluição das amostras*. A eluição deve ser total e geralmente é feita com incubação com o tampão de ensaio, "overnight" (8 a 12 horas)<sup>(18,19,22)</sup>.

#### 7) Equipamentos

Existem vários métodos e assim diversos aparelhos podem ser usados:

- teste de Guthrie, em placas<sup>(18)</sup>
- espectrofluorimetria em auto-analyzer<sup>(19)</sup>
- cromatografia em HPLC
- fluorimetria em "Delfia" da Pharmacia (LKB)<sup>(8)</sup>
- radioimunoensaio com <sup>125</sup>I, em contador de radiação gama<sup>(23)</sup>
- SUMA, através de ELISA

#### 8) Seleção da população de risco

Em 1987, houve em Maryland (USA), precisamente no N.I.H.<sup>(13)</sup>, uma conferência em erros inatos do metabolismo e várias questões foram levantadas e pela primeira vez elaborou-se um programa:

- amostragem deve ser universal
- educação da população de risco (aconselhamento genético)
- a herança é autossômica recessiva
- seleção pré-natal: difícil nos países pobres
- trabalhar direto com as Secretarias da Saúde, para melhor controle populacional
- obrigatoriedade; as leis devem prever a seleção

### CONCLUSÃO

Cerca de 1 a 2% dos recém-nascidos com hiperfenilalaninemia são deficientes em BH4. Deve-se avaliar os níveis de pterinas nos pacientes com deficiência de tetrahydropterina (BH4). Geralmente devemos avaliar a atividade da dihidropterina redutase (DHPR) nos glóbulos vermelhos (RBC). Recomenda-se o uso de altas doses de BH4, mais ou menos 20mg/Kg de peso corporal, para a realização do teste<sup>(13,14)</sup>.

RIALA6/794

MARTINS, H.P. - Phenylketonuria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):47-52, 1996.

ABSTRACT: The interest of genetics diseases is increasing in the developed countries while the control of infectious and sociables diseases carried out more effective. Recent date<sup>21</sup> prove about 50% of the perinatal dies occur by genetics causes. Furthermore, one third of the adults cronic diseases are attribute to genetics factors.

Are esteem in about 50.000 to 100.000 the ours genes, disperse as 23 pairs of chromosomes which are responsible by the hereditaries attributes. By the other hand, its are already know about 6000 genetics diseases, the greateryet no treated<sup>11</sup>. The great challenge of the genetecists are been identify our genes and to understand what are the mechanism which cause genetic pathology and while don't have effective treatment, to prevent the birth of new affected.

The amino and organic acid are the metabolic inborn errors more frequent in the neonatal period<sup>2</sup>. In Germany, about 1:15000 of childhood are diagnosticated as organoacidpathies bearer<sup>1</sup>. Mainly in the organoacidpathies there are more evidences that this number must be greater.

KEY WORDS: Metabolic disorders - Amino acido inborn errors - PKU

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOFFMANN, G.F.; TREFZ, F.K. & BREMER, H.J. - "Selective screening for amino and organic inborn errors". *Wien. Klin. Wochenschr.* **104** (21) : 651-7,1992.
2. IRONS, M. - "Screening for metabolic disorders. How are you doing?" *Pediatric Clin. North Am.* **40**(5): 1073-85, 1993.
3. UDENFRIEND, S. & COOPER, J.R.: - "Assay of L-phenylalanine as phenylalanine after enzymatic decarboxylation: Application to isotopic studies". *J.Biol. Chem.* **203**: 953-958, 1953.
4. ALBERT, A. - "The pteridines". *Quarterly Revs.* **6**: 197-210, 1952.
5. BICKEL, H.; GERRARD, J. & HICKMANS, E.M. - "The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behavior of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr.* **43**:64-69, 1954.
6. HEMMILÄ, I.2 - "Europium as a label in time resolved immunofluorometric assay". *Anal. Biochem.* **137**:335-43, 1984.
7. PETTERSON, K. - Time resolved fluoroimmunoassay of human choriogonadotrophin". *Clin. Chem.* **29**:60-4, 1983.
8. SOINI, E. & KOGOLA, H.: "Time resolved fluorometer for lanthanide chelates a new generation of non-isotopic immunoassays". *Clin. Chem.* **229**:65-68, 1983.
9. KRISTIANSOON, B.; STIBLER, H. & WIDE, L. - "Gonadal function and glycoprotein hormones in the carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) syndrome". *Acta Paediatr.* **84**(6): 655-60, 1995.
10. COLLINS, F.S. - "Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications". *Science.* **256**: 774-9,1992.
11. MCKUSICK, V& AMBERGER, J.S. - "The morbid anatomy of the human genome: chromosomal location of mutations causing diseases". *J. Med. Genet.* **26**:265-9, 1994.
12. CASHEY, C.T. - "Molecular medicine: a spin off from the helix". *J.Am. Med. Ass.* **269**: 1986-1992,1993.
13. PONZONE, A.; GUARDAMAGNA, O. & COTTON, R.G.H. - "Screening for malignant phenylketonuria". *Lancet I*: 512-7, 1987.
14. ENDRES, W.; IBEL, H. & CURTIUS, H.- CH. - "Tetrahydrobiopterina and "non-responsive" dihydropterine redutase deficiency". *Lancet II*: 223-5,1987.
15. AZIBI, K.; BACHNER, L. & CHAOUCH, A.- "Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of 50 kDa dystrophin associated glycoprotein maps to chromosom 13q 12". *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1423-28,1993.
16. SCHMIDT, B.J.; MARTINS, A.M.M.; FISBERG, R.; ADELL, A.C.C. & DIAMENT, A. J.- "Phenylketonuria (PKU) - The Brazilian Experience". *Anal. of International Screening Symposium of Inborn Errors of Metabolism.* November: 6-9, 1988.

17. CARPENTER, G.C.; AWERBACK, V.H. & DIGEORGE, A.M. - "Phenylketonuria". *Pediatric Clin. North. Am.* **15**:313, 1968.
18. GUTHRIE, R. - "Blood screening for phenylketonuria". *J.Am. Med. Assoc.* **178**:863-864, 1961.
19. MCCAMAN, M.W. & ROBINS, E. - "Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum". *J. Lab. Clin. Med.* **59**:885,1962.
20. WONG, P.; O'FLYNN, M. & INOUE, T. - "Micromethods for measuring phenylalanine and tyrosine in serum". *Clin. Chem.* **10**: 1098-1104,1964.
21. FELICE, K.J.; ALESSI, A.G. & GRUNNET, M.L. - "Clinical variability in adult-onset acid maltase deficiency: Report of affected sibs and review of literature". *Medicine* **74**(3): 131-5, 1995.
22. CHOPRA, I.J.; WU-SING-YUNG & SANTINI, F. - "A radioimmunoassay for measurement of 3,5,3'- triiodothyronine sulfate: Studies in thyroidal diseases, pregnancy and neonatal life". *J.Clin. Endocrinol Metab.* **75**(1); 189-194, 1992.

Recebido para publicação em 11/7/95

## ALTERAÇÕES NA QUALIDADE DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO POR FILTROS DOMÉSTICOS\*

Linda NISHIHARA\*\*

Janete ALABURDA\*\*

RIALA6/795

NISHIHARA, L. e ALABURDA, J. - Alterações na qualidade da água de abastecimento por filtros domésticos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):53-57, 1996.

**RESUMO:** Filtros domésticos foram avaliados através dos resultados de análises físico-químicas das águas filtradas comparados aos das não filtradas. Os parâmetros analisados foram: cor, turbidez, resíduo seco, pH, dureza, oxigênio consumido, concentração de ferro, de nitrato, de cloreto e de cloro residual.

Na maioria das águas filtradas analisadas houve melhoria nos parâmetros cor e turbidez; ainda, devido à retenção de cloro verificada em todos os filtros analisados, deduz-se que o sabor também foi melhorado. Uma porcentagem significativa de filtros causou um acréscimo nas concentrações de resíduo seco e dureza, respectivamente 70% e 61%; e, em alguns casos, houve um aumento na quantidade de nitrato (30%) e de oxigênio consumido (12%) nas águas submetidas à filtração. Deste modo, constatou-se que substâncias liberadas do material constituinte de alguns filtros comprometem o seu desempenho.

**DESCRIPTORIOS:** Filtros domésticos, Purificadores de água, Água de abastecimento, Parâmetros físico-químicos de águas de abastecimento.

### INTRODUÇÃO

A qualidade das águas de abastecimento distribuídas à população tem sido afetada em consequência da eutrofização dos mananciais e da ocorrência de doenças de veiculação hídrica.

Gosto e odor estranhos são transmitidos à água originária de mananciais afetados pelo crescimento rápido e abundante de algas, devido à alta produtividade biológica causada pela contaminação desses reservatórios, principalmente por compostos contendo nitrogênio e fósforo provenientes de esgotos domésticos e industriais<sup>1</sup>. Estas propriedades organolépticas também são afetadas devido à presença de cloro residual na água de abastecimento, o qual é fundamental para um processo eficiente de desinfecção<sup>6</sup>. No Estado de São Paulo, a Resolução Conjunta SS/SMA-4 de 27/05/92 aumentou para 0,5 ppm o teor de cloro residual como medida sanitária para fazer frente às

epidemias do cólera e do dengue; porém, tem se verificado que o limite de 0,05 ppm é o ideal para não afetar gosto e odor da água a ser ingerida e impedir a proliferação de bactérias<sup>12</sup>. Em contraposição aos benefícios da desinfecção, nas condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C), o cloro reage com a água para produzir ácido hipocloroso, o qual pode penetrar na parede celular destruindo sua integridade e permeabilidade, reagir com grupos sulfidril (SH) da cisteína e inibir várias enzimas<sup>4</sup>. Ainda, também pode ocorrer o aparecimento de cor e turbidez nas águas destinadas ao consumo humano, em decorrência da corrosão de tubulações metálicas que, entre outros fatores, é causada pela ação do cloro.

Com a finalidade de melhorar estas características, diversos filtros domésticos têm surgido no mercado apesar de não haver uma legislação específica para estes sistemas filtrantes e, como consequência, inexistir controle sobre a sua eficiência. Desta forma, a

\* Realizado na Seção de Águas, Instituto Adolfo Lutz, Capital, SP.

\*\*Do Instituto Adolfo Lutz, Capital, SP.

população utiliza-se de recursos para purificação de águas cujos resultados muitas vezes são desconhecidos.

A literatura sobre filtros ainda é bastante escassa, sendo que as poucas referências bibliográficas dizem respeito a estudos sobre atividade bacteriana<sup>3,5,8,9</sup>. Desta forma, visando uma contribuição com relação aos efeitos da filtração sobre os parâmetros físico-químicos da água de consumo, foram examinados vários filtros de diferentes marcas disponíveis no mercado, com base no decreto 12.486 de 20/10/78 do Estado de São Paulo em sua NTA 60, que estabelece normas sobre a potabilidade das águas de abastecimento<sup>10</sup>.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 32 filtros comercializados no Estado de São Paulo, sendo que todos continham carvão ativado como material adsorvente e aproximadamente 80% destes possuíam prata como agente bactericida.

A água utilizada foi a obtida na torneira do laboratório, a qual é proveniente da rede pública de abastecimento. Para evitar a contaminação da água filtrada com eventuais resíduos dos elementos filtrantes que pudessem ser arrastados a partir do filtro em início de operação, os primeiros 5 litros de água filtrada foram descartados. A vazão utilizada foi de aproximadamente 40 litros/hora. Essas condições seriam uma simulação aproximada daquelas empregadas numa residência.

Para cada filtro examinado foi feita a análise físico-química da água antes e depois do processo de filtração. Foram analisados os parâmetros físico-químicos da legislação estadual sobre potabilidade de águas de abastecimento público, a saber: cor, turbidez, resíduo seco, pH, dureza, oxigênio consumido, nitrato, ferro, cloreto e cloro.

Todas as análises foram realizadas de acordo com os métodos descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>11</sup>.

#### RESULTADOS

Os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos das águas de abastecimento filtradas são apresentados a seguir. Estes resultados correspondem à comparação das propriedades avaliadas das águas filtradas e da não filtrada. Foi feita a relação entre o número de filtros nos quais houve aumento no valor do parâmetro analisado na água filtrada, sempre em comparação ao da água não filtrada, com o número total de filtros analisados. Relações análogas foram feitas nos casos em que os resultados da análise das águas filtradas apresentaram uma constância ou diminuição. Essas relações foram expressas em porcentagem e são apresentadas na Tabela 1.

Dentre os 32 filtros analisados, as águas filtradas provenientes de 4 deles foram condenadas segundo a

TABELA 1

Alterações dos parâmetros de potabilidade em decorrência do processo de filtração. Categorias das variações (aumento / constância / diminuição) expressas em porcentagens sobre o total de filtros avaliados.

PARÂMETRO ANALISADO	VARIAÇÃO(%)		
	AUMENTO	CONSTANTE	DIMINUIÇÃO
cor	0	82	18
turbidez	12	53	35
resíduo seco	70	12	18
pH	32	38	30
dureza total	61	18	21
oxigênio consumido	12	72	16
nitrato	30	64	6
ferro	0	29	71
cloreto	21	38	41
cloro	0	0	100

legislação estadual devido ao elevado teor de oxigênio consumido.

## DISCUSSÃO

A filtração da água é um processo físico-químico para a separação de impurezas pela passagem através de um material granulado ou poroso, sendo que as partículas suspensas e espécies dissolvidas ficam física e quimicamente retidas nos interstícios e superfícies adsorventes de materiais como, por exemplo, o carvão ativado<sup>2</sup>.

A existência de partículas afeta a qualidade da água, principalmente sua aparência, alterando entre outros parâmetros, a cor e a turbidez. Estas características envolvem aspectos de ordem estética e psicológica, exercendo uma certa influência negativa sobre o consumidor, mesmo que dentro de certos limites não influam na questão sanitária do produto. Com a retenção destas partículas por materiais adequados, deve-se observar uma variação na magnitude destes parâmetros.

No presente trabalho, verificou-se que para a maioria dos filtros examinados os resultados obtidos com relação à cor foram praticamente constantes, isto é, o processo de filtração foi insignificante sobre este parâmetro. No entanto, deve-se ressaltar que nos experimentos realizados foi utilizada água de abastecimento cuja magnitude para esta propriedade estava no limite de detecção do equipamento (5 unidades Hazen, uH), sendo que qualquer pequena variação neste parâmetro não era detectado pelo aparelho utilizado em função de sua sensibilidade, de forma que o método utilizado não forneceu subsídios conclusivos quanto ao fator cor. Somente foi possível verificar que os filtros foram eficientes quanto a esse parâmetro, nas análises realizadas com águas de abastecimento que apresentaram um valor superior a 5 uH. Desta maneira, 18% dos filtros produziram melhoria na cor da água filtrada.

Os resultados obtidos com relação à turbidez, por sua vez, proporcionam uma melhor avaliação quanto à eficiência dos filtros no processo de retenção de partículas suspensas. Neste caso, pode-se observar que o sistema de filtração na maioria dos experimentos manteve (53%) ou melhorou (35%) a qualidade da água de abastecimento, resultado que está de acordo com a finalidade do processo de filtração. A turbidez é uma característica decorrente da presença de partículas em suspensão, isto é, sólidos finamente divididos ou em estado coloidal<sup>2</sup>, sendo que a predominância dos resultados constantes deve-se provavelmente às substâncias coloidais que não seriam retidas pelos filtros devido à alta porosidade dos materiais filtrantes. Foram raros os casos em que a turbidez aumentou (12%), em fun-

ção da liberação de material particulado proveniente dos filtros.

Com relação ao resíduo seco houve um aumento significativo (70%) na maioria dos sistemas analisados, o que sugere que as águas filtradas carregam substâncias solúveis provenientes dos materiais utilizados como elementos filtrantes. Esta observação é reforçada pelos resultados referentes ao aumento da dureza da água após a filtração. Das análises efetuadas, infere-se que o aumento na dureza provavelmente corresponde a carbonatos alcalinos terrosos, os quais são provenientes de materiais filtrantes, tais como a dolomita. O aumento na dureza devido aos carbonatos também tem sido relatada na literatura. Ainda, o fato de ocorrer um aumento na concentração de carbonatos dissolvidos nas águas filtradas justifica a variação observada nos valores de pH.

O teor de oxigênio consumido por uma amostra de água está relacionado com a quantidade de matéria orgânica presente e com o grau de oxidação em que a mesma se encontra<sup>2</sup>. Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se concluir que os filtros examinados predominantemente não alteram a quantidade de substâncias redutoras, entre as quais se incluem os compostos orgânicos.

Na maioria dos casos houve uma diminuição do teor de ferro nas águas filtradas, significando que o material filtrante apresenta características favoráveis à sua retenção, fator importante para os locais com encanamentos antigos e corroídos, principal motivo de contaminação da água de abastecimento com íons férricos. Muitas vezes os compostos de ferro podem ser encontrados no estado coloidal, dificultando a sua retenção por materiais que não apresentam baixa porosidade, fato que deve estar relacionado com a constância dos resultados observados (29%).

Quanto ao teor de nitrato presente nas águas de abastecimento, verifica-se que na maioria dos casos ocorre uma constância nestes valores; porém, em 30% das águas filtradas houve um aumento neste teor, o que deve estar relacionado com o fato da maioria dos filtros analisados (27 filtros domésticos) possuírem em sua composição prata como agente bactericida. Um processo de deposição de prata sobre carvão ativado por adsorção deste elemento, a partir de uma solução de nitrato de prata em contato com o carvão, possivelmente causou o aumento de íons nitrato por solubilização do nitrato de prata que não foi reduzido no processo. Ainda, o acréscimo de íons nitrato nas águas filtradas foi acompanhado por uma diminuição no teor de íons cloreto, sendo que esses resultados vêm ratificar a suspeita de solubilização do nitrato de prata em excesso, de maneira que os íons prata seriam depositados na forma de cloretos, que são bastante insolúveis em água, ficando retidos nos interstícios dos materiais filtrantes.

Todos os filtros examinados apresentaram a propriedade de reter o cloro residual existente na água de abastecimento por adsorção em carvão ativado.

### CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se verificar que na maioria dos casos os filtros analisados melhoram ou mantêm os parâmetros organolépticos como cor e turbidez, fatores bastante significativos para o consumidor de água filtrada e usuário de filtros domésticos. Ainda, a retenção de cloro residual observada em 100% dos casos certamente melhorou o sabor das águas filtradas. Ressalve-se porém, que é recomendável um teor de 0,05 ppm em cloro residual<sup>7</sup> para prevenir o crescimento de bactérias.

A eficiência dos filtros também foi observada através da diminuição de teores de ferro na água filtrada. Por outro lado, em contraposição à finalidade da filtração, verificou-se para a maioria dos filtros analisados um aumento na quantidade total de material dissolvido, expresso tanto em termos de acréscimo no resíduo seco quanto na dureza total. Outra questão significativa foi o fato de haver acréscimo na concen-

tração de nitrato nas águas provenientes de 30% dos filtros examinados, o que deve estar relacionado ao processo de deposição de prata no material filtrante. Apesar de não terem sido constatadas concentrações de nitrato que levassem à condenação da água filtrada, o aumento detectado é significativo, pois este íon está relacionado com a meta-hemoglobinemia em crianças e com a formação de nitrosaminas, as quais possuem ação carcinogênica<sup>12</sup>.

Pode-se concluir que as características aparentes da água após a filtração foram melhoradas; porém, a eficiência de grande parte dos filtros analisados foi precária devido ao acréscimo observado em certos componentes químicos da água filtrada. Saliente-se, porém, que dos 32 filtros analisados nenhum foi totalmente eficiente quanto à melhoria simultânea de todos os parâmetros de potabilidade analisados.

### AGRADECIMENTOS:

Agradecemos aos funcionários R. Cotrim, C.A. Nunes e M.L.P. Ruggeri, da Seção de Águas do Instituto Adolfo Lutz-central, pelo apoio na parte experimental deste trabalho.

RIALA6/795

NISHIHARA, L. and ALABURDA, J. - Changes in drinking water quality submitted to household filters. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):53-57, 1996.

ABSTRACT: Physico-chemical analysis of filtered water from household filtration systems were compared with one of unfiltered water in order to evaluate such systems. The determinations included colour, turbidity, dried residue, pH, hardness, oxygen consumption, iron, nitrate, chloride and free chlorine.

Improvement in colour and turbidity was observed in most of the cases, the taste also improved due to the retention of the free chlorine by the totality of filters analysed. However, in the filtered water was observed an increase of 70% and 61% of dried residue and hardness, respectively, some filters also caused an increase in oxygen consumption (30%) and nitrate concentration (12%) after the filtration.

DESCRIPTORS: Filter-water, Drinking water, Physical-chemical parameters of drinking water.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Water quality and treatment: a handbook of community water supplies - American Water Works Association, 4<sup>th</sup> ed., New York, McGraw Hill-Inc, 1194p., 1990.
2. AZEVEDO NETTO, J.M. - Técnica de abastecimento e tratamento de água, volume I: abastecimento de água, CETESB/ASCETESB, 3<sup>a</sup> ed., São Paulo, 332p., 1987.
3. GELDREICH, E.E.; TAYLOR, R.H.; BLANNON, J.C.; REASONER, D.J. - Bacterial colonization of point-of-use water treatment devices. *J. Am. Water Works Association*, 77, 72-80, 1985.
4. KREFT, P. - Converting from chlorine to chloramines: a case study. *J. Am. Water Works Association*, 77, 38-45, 1985.
5. LEE, E.L.; LI, C.T. - Elimination of bacterial contamination in water-filter of tap-water by back-washing. *Food-Science*, 15(1), 66-72, 1988.

6. NICOLSON, N.J. - An evaluation of the method for determining residual chlorine in water. *The Analyst*, **90**, 187-198, 1965.
7. PEDRO, N.A.R. - Avaliação da eficiência de filtros domésticos para melhoria da água consumida pela população. *Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo*, 1990.
8. PRATI, L.; VITALOLI, M.; STEFANATI, A.; CENCI, P.; SALETTI, C.; RAUSA, G. - Domestic water purification for developing countries. *Igiene-Moderna*, **95**(3), 311-320, 1991.
9. PIRES, E.M.F.; FREITAS, C.P. - Atividade bactericida de purificadores de água de uso doméstico. *B. Ceppa*, **8**(2),74-82, 1990.
10. São Paulo, Leis e Decretos - Código Sanitário de 1978 - Decreto Estadual nº 12.486, *D.O.E.S.P.* de 20/10/78, 280-283, SP.
11. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, volume 1: *Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*, 3ª ed., p. 302-330, 1985.
12. TAYLOR, R.H. - Testing of home use carbon filters. *J. Am. Works Association*, **71**, 577-579, 1979.

Recebido para publicação em 22/11/94.

## DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E PRODUTOS DE CHOCOLATE POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA\*

Helena Yuco YABIKU\*\*  
Iracema de Albuquerque KIMURA\*\*

RIALA6/796

YABIKU, H.Y. & KIMURA, I.A. - Determinação de teobromina e cafeína em cacau e produtos de chocolate por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):59-64, 1996.

**RESUMO:** Com o objetivo de determinar os teores de teobromina e cafeína, 77 amostras de produtos de chocolate foram analisadas. As amostras testadas foram 12 amostras de massa de cacau, 4 amostras de aromas de cacau e 61 amostras de alimentos à base de cacau, tais como barras de chocolate, bebidas lácteas, biscoitos, bolos, sorvetes, etc. de diferentes marcas. O método utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos, coluna C<sub>18</sub> e fase móvel metanol - água - ácido acético (20:79:1). A quantificação foi feita por padronização externa.

**DESCRITORES:** Produtos de chocolate, Teobromina e cafeína, técnica: Cromatografia líquida de alta eficiência, determinação.

### INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse entre os profissionais da Saúde, no conhecimento do teor de metilxantinas, entre elas a teobromina e a cafeína nos produtos alimentícios.

Este fato ocorreu desde que a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos retirou a cafeína da lista de drogas geralmente reconhecidas como seguras, "Lista GRAS" e tem alertado às mulheres, principalmente as grávidas, no sentido de consumir pouco ou mesmo evitar, alimentos e drogas contendo cafeína<sup>1</sup>.

Existem evidências, ainda que não comprovadas, de que a cafeína atravessa livremente a placenta, e pode causar possivelmente defeitos de nascença em humanos semelhantemente àqueles observados em animais<sup>4</sup>.

Sob o ponto de vista fisiológico, segundo o Pharmaceutical Codex 1979, estes 2 alcalóides atuam em diferentes níveis: como estimulador do sistema nervoso central e como diurético. Enquanto a cafeína tem

ação diurética fraca, é um grande estimulador do sistema nervoso central. A teobromina possui ação diurética semelhante à cafeína, porém, não possui ação estimulante do sistema nervoso central<sup>10</sup>.

A importância da teobromina está no seu metabolismo, uma vez que a metilação da mesma leva a produzir cafeína<sup>1</sup>.

Existem vários estudos sobre o conteúdo da cafeína em chá, café e cacau, porém, poucas informações sobre o teor de teobromina em produtos de chocolate<sup>2, 4, 5, 6, 7, 8</sup>.

Os primeiros trabalhos publicados na literatura sobre a análise de cafeína e teobromina eram bastante difíceis e extremamente morosos, devido à impossibilidade do método clássico utilizado em separar a cafeína da teobromina. Por outro lado, ainda havia uma dificuldade suplementar em produtos contendo grandes quantidades de açúcar.

A análise da teobromina, tal como tem sido feita pelo método gravimétrico, é bastante onerosa e trabalhosa<sup>6,12</sup>.

\* Realizado na Seção de Aditivos e Resíduos de Pesticidas

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

Com o advento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), atualmente permite a separação e quantificação da teobromina e cafeína quando presentes numa mesma amostra<sup>1, 2, 3, 8, 9, 11, 13</sup>.

Nesse sentido, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a concentração de teobromina e cafeína em amostras de cacau e produtos de chocolate utilizando a técnica de CLAE.

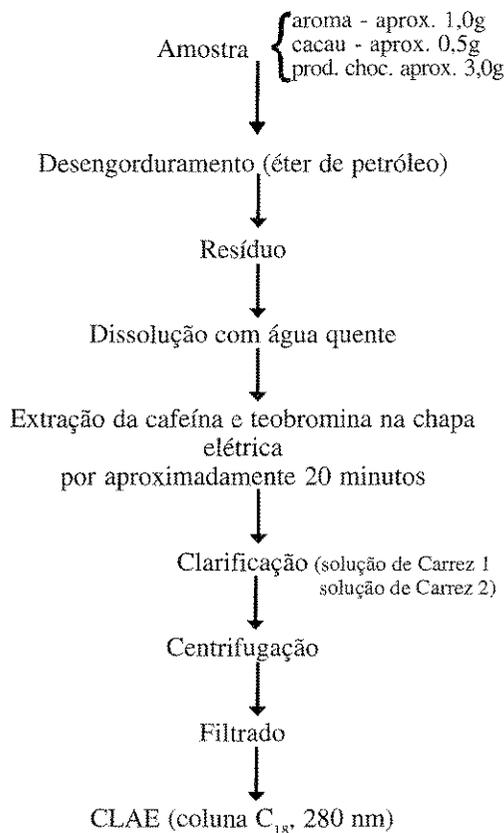
## MATERIAL E MÉTODO

### Material

Amostras de cacau de diversas procedências, aromas à base de cacau e produtos de chocolate, tais como biscoitos, bolos, bebidas lácteas, alimentos achocolatados, sorvetes, etc, totalizando 77 amostras foram adquiridas junto a empresas do ramo e supermercados da Cidade de São Paulo, em colaboração com o Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

### Método

O método empregado foi o descrito por BRERETON e alii<sup>3</sup> cujo procedimento basicamente encontra-se esquematizado a seguir:



### Preparo das Soluções

Solução de Carrez 1: dissolver 219g de acetato de zinco em aproximadamente 500 ml de água do Milli-Q e 30 ml de ácido acético 0,1 mol/L. Transferir para um balão volumétrico de 1 litro, completando o volume com água.

Solução de Carrez 2: dissolver 106g de ferrocianeto de potássio em aproximadamente 500mL de água e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1 litro, completando-o com água.

Solução-estoque de teobromina (250µg/mL): pesar 50mg de teobromina, dissolver em água e aquecer, se necessário, transferindo a solução para um balão volumétrico de 200 mL, completando-o com água.

Solução-padrão de trabalho de teobromina: diluir 1, 2, 3, 4 e 5mL da solução-estoque de teobromina para 100mL com água.

Solução-estoque de cafeína (500µg/mL): pesar 50mg de cafeína, dissolver em água e completar a 100 mL, no balão volumétrico.

Solução-padrão de trabalho de cafeína: diluir 1, 2, 3, 4 e 5mL da solução-estoque de cafeína para 100mL no balão volumétrico.

### Equipamento

Foi utilizado o cromatógrafo líquido Hewlett Packard, modelo 1090 com detector de arranjo de diodos. As condições cromatográficas de trabalho foram:

coluna: Lichrosphere 100 RP-18 em Lichrocart 125-4 (Merck)

fase móvel: metanol-água-ácido acético (20:79:1)

fluxo da fase móvel: 1,0ml/min

temperatura do forno: 35°C

comprimento de onda: 280nm

volume de injeção: 20 µL

Os solventes e as amostras foram filtradas através de membranas filtrantes (Millipore) antes de serem introduzidas no cromatógrafo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de teobromina e cafeína encontrados nos vários tipos de alimentos coletados de vários supermercados da Cidade de São Paulo, são apresentados na Tabela I.

Para cada marca de alimento foi feita análise em duplicata e tirado um valor médio.

Os valores apresentados na Tabela 1 representam a média dos valores médios de cada marca de alimento analisado.

Os teores de teobromina e cafeína foram determinados pelo cálculo das áreas de seus picos cromatográficos, utilizando o método de padrão externo.

As curvas-padrões de teobromina e cafeína apresentaram-se lineares dentro dos intervalos de concentrações examinados de 25ng a 125ng.

A avaliação do teste de recuperação foi conduzida em quatro diferentes matrizes: massa de cacau, biscoitos recheados sabor chocolate, alimentos achocolatados e chocolate em pó solúvel.

Inicialmente as amostras foram determinadas quanto ao conteúdo de teobromina e cafeína. Em seguida, as amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas dos padrões de teobromina e cafeína, isto é, a metade e o dobro das quantidades encontradas em cada amostra.

Os testes foram realizados em triplicata.

As médias e os desvios-padrões das recuperações em porcentagem corrigidas pela subtração dos valores-controle encontrados em diferentes substratos foram de 99,3% e 2,8% para teobromina e 97,5% e 3,3% para cafeína (Tabela 2).

Os teores dos alcalóides teobromina e cafeína encontrados na massa de cacau, alimentos achocolatados em pó, e as barras de chocolate foram semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores<sup>4, 5, 9, 13</sup>.

É evidente que com o acréscimo da manteiga de cacau, sólidos lácteos e açúcar à massa de cacau que é a substância-base ou de partida para todos os produtos à base de chocolate, ocorre uma diminuição nos teores de teobromina e cafeína no produto final.

A massa de cacau é um alimento sólido ou semi-sólido obtida a partir da moagem do miolo da semente de cacau. Foram analisadas 12 amostras de massa de cacau de 7 diferentes procedências quanto ao conteúdo de teobromina e cafeína.

Os valores médios de teobromina e cafeína foram 1,31% e 0,16%, respectivamente, com variação de 1,12 - 1,50% e 0,14 - 0,20%, respectivamente (Tabela 1). A ligeira variação nos teores dos alcalóides pode ser atribuída a vários fatores como variedades diferentes, grau de maturidade das sementes na ocasião da colheita e diferenças no grau de fermentação.

O cacau vendido no comércio (cacau em pó parcialmente desengordurado) sob a forma de pó é prepa-

rado através da pulverização do material remanescente após a remoção da matéria graxa (manteiga de cacau) da massa de cacau.

Uma vez que a teobromina e a cafeína permanecem na porção não graxa da massa, o cacau comercial vendido desengordurado possui concentração maior de teobromina e cafeína que a massa de cacau.

Os valores médios de teobromina e cafeína encontrados foram de 2,22% e 0,24% respectivamente.

As barras de chocolate de diversos tipos como ao leite, branco e meio-amargo também foram pesquisados quanto ao conteúdo de teobromina e cafeína (Tabela 1).

Como era de se esperar, a barra de chocolate branco não apresentou nenhum conteúdo de teobromina e cafeína. Em relação à barra de chocolate meio-amargo, o teor médio de teobromina e cafeína encontrados foram de 0,84% e 0,10% respectivamente.

Na barra de chocolate ao leite, os teores de teobromina e cafeína encontrados foram de 0,15% e 0,04%, respectivamente. Esses valores são inferiores aos do tipo meio-amargo, uma vez que são introduzidos os sólidos de leite, além dos componentes normais utilizados em ambos os tipos de chocolate que são a massa de cacau e manteiga de cacau.

Os aromas naturais de cacau analisados eram compostos de extrato de cacau, extrato de baunilha, vanilina, etil vanilina e maltol, sendo que os teores de teobromina e cafeína variaram de 0,11% a 0,34% e 0,02% a 0,07% respectivamente.

Vários outros alimentos, tais como biscoitos, bebidas lácteas, coberturas de chocolate, sorvetes, etc, também foram analisados, conforme apresentados na Tabela 1.

Os resultados encontrados indicam que o método é bastante preciso e exato e que a técnica quantifica satisfatoriamente os dois alcalóides, conjuntamente.

A análise da teobromina e cafeína leva aproximadamente 2 horas desde a pesagem da amostra até a injeção do extrato no cromatógrafo líquido, com grande vantagem em relação ao método oficial, gravimétrico utilizado até então, que levava aproximadamente 2 dias.

## CONCLUSÃO

O método utilizado para quantificar a teobromina e a cafeína, simultaneamente, mostrou-se bastante exato e preciso, como demonstrado pela avaliação da recuperação, sugerindo a adoção deste método como método oficial na determinação de teobromina.

TABELA 1

Níveis de teobromina e cafeína encontrados nos diferentes alimentos analisados.

Alimento	Nº de marcas analisadas	Nº de amostras analisadas	Média de Teobromina (%)	Intervalo de Teobromina (%)	Média de Cafeína (%)	Intervalo de Cafeína (%)	Total de Alcalóides (%)
Barra de chocolate							
Ao Leite	2	2	0,15	0,14 - 0,15	0,04	0,02 - 0,05	0,19
Branco	2	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Meio-amargo	2	2	0,84	0,79 - 0,88	0,10	0,09 - 0,10	0,94
Alimento Aço- colatado em pó	7	7	0,33	0,19 - 0,38	0,04	0,02 - 0,08	0,37
Mistura prepa- rada para bolo	3	3	0,15	0,13 - 0,17	0,02	0,02	0,17
Biscoito recheado	3	4	0,09	0,05 - 0,13	0,01	0,00 - 0,02	0,10
Bebida láctea	1	1	0,15	0,15	0,01	0,01	0,16
Composto Ali- mentar	3	4	0,33	0,15 - 0,64	0,04	0,01 - 0,08	0,37
Licor de cacau e/ou chocolate	4	6	0,03	0,02 - 0,07	0,00	0,00 - 0,01	0,03
Cobertura de chocolate	2	2	0,16	0,11 - 0,20	0,03	0,02 - 0,03	0,19
Pão de mel	1	1	0,09	0,09	0,01	0,01	0,10
Bolo	4	4	0,05	0,01 - 0,08	0,00	0,00	0,05
Rocamboles	1	1	0,09	0,09	0,01	0,01	0,10
Marshmallow	1	1	0,24	0,24	0,04	0,04	0,28
Alim. enriq. c/ vit. e sais minerais	2	2	0,13	0,09 - 0,16	0,01	0,01	0,14
Alim. à base de extrato de malte	1	1	0,30	0,30	0,01	0,01	0,31
Cookies	1	1	0,30	0,30	0,04	0,04	0,34
Sorvetes	9	10	0,08	0,03 - 0,15	0,01	0,00 - 0,01	0,09
Chocolate em pó solúvel	2	2	0,77	0,75 - 0,78	0,11	0,10 - 0,11	0,88
Massa de cacau	7	12	1,31	1,12 - 1,50	0,16	0,14 - 0,20	1,47
Cacau em pó parc. deseng.	3	3	2,22	2,15 - 2,27	0,24	0,23 - 0,24	2,46
Chocolate em pó parc. deseng.	2	2	1,13	1,10 - 1,15	0,13	0,12 - 0,14	1,26
Aroma natural de cacau	4	4	0,24	0,11 - 0,34	0,05	0,02 - 0,07	0,29
<b>Total de amostras analisadas</b>		<b>77</b>					

TABELA 2

Recuperação (%) de teobromina e cafeína em diferentes substratos.

AMOSTRA	TEOBROMINA		CAFEÍNA	
	MÉDIA	DP*	MÉDIA*	DP*
Massa de cacau	100,8	3,5	95,3	3,7
Biscoito Recheado	98,9	2,5	100,7	2,4
Alimento Achocolatado	97,2	3,1	95,4	3,6
Chocolate em pó solúvel	100,4	2,0	98,4	3,3
Média	99,3	2,8	97,5	3,3

\* Média e desvio padrão de análises em triplicata

O presente trabalho apresentou um perfil dos conteúdos de teobromina e cafeína em produtos de chocolate, atendendo à necessidade destes conhecimentos por parte dos profissionais da Saúde.

#### AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a colaboração do Centro de Vigilância Sanitária (ERSA-2), em especial à Dra. Cecília Cibele Zepellini pela coleta das amostras.

RIALA

YABIKU, H. Y.; KIMURA, I. A. - High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):59-64, 1996.

ABSTRACT: In order to investigate the levels of theobromine and caffeine, 77 samples of chocolate liquor and commercial chocolate products were analysed. The samples tested included 12 samples of chocolate liquor, 4 samples of cocoa flavour and 61 samples of commercial chocolate products like sweet bar chocolate, milk beverages, biscuits, cakes, ice-cream, etc from different brands. A liquid chromatography technique was developed using a diode array detector, a C<sub>18</sub> column and methanol-water-acetic acid (20:79:1) as mobile phase. Quantitation was carried out by external standardization.

DESCRIPTORS: chocolate products, theobromine and caffeine, high pressure liquid chromatographic determination.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15<sup>th</sup> ed., Arlington, Virginia, p. 776 (980.14), 1990.
2. BLAUCH, J.L. & TARKA J.R., S.M. - HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.*, **48**:745-50, 1983.
3. BRERETON, P., HAGUE, M. & WOOD, R. - The determination of theobromine in cocoa and chocolate products. *J. Assoc. Publ. Analysts*, **30**:49-54, 1994.
4. CRAIG, W.J. & NGUYEN, T. T. - A research note - Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *J. Food Sci.*, **49**:302-305, 1984.
5. DE VRIES, J.W., JOHNSON, K.D. & HEROFF, J.C. - A research note HPLC determination of caffeine and theobromine content of various natural and red dutched cocoas. *J. Food Sci.*, **46**:1986-9, 1981.
6. GERRITSMA, K.W. & KOERS, J. - Determination of theobromine in cocoa residues. *Analyst*, **4**:201-5, 1953.
7. HAMANN, Y.; TISSE, C. & ESTIENNE, J. - Etude de la teneur en théobromine par

- chromatographie liquide haute performance des fèves de cacao. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **828**(6): 271-76, 1984.
8. HURST, W.J.; SYNDER, P.S. & MARTIN JR., R.A. - Use of microbore high-performance liquid chromatography for the determination of caffeine, theobromine and theophylline in cocoa. *J. Chromatogr.*, **318**(2): 408-411, 1985.
  9. KREISER, W.R. & MARTIN JR., R.A. - High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products: collaborative study. *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, **63**(3):591-4, 1980.
  10. LOVE, L.J. - Caffeine, theophylline and theobromine in New Zealand Foods. *Food Technology in New Zealand*, January, 29-31, 1989.
  11. MUHTADI, F.J.; EL-HAWARY, S.S. & HIFNAWY, M.S. - Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different products. *J. Liquid Chromatogr.*, **13**(5):1013-1028, 1990.
  12. SÃO PAULO, Instituto Adolfo Lutz - *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. V.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3ª ed., São Paulo, p. 175-7, 1985.
  13. ZOUMAS, B.L.; KREISER, W.R. & MARTIN, R.A. - Theobromine and caffeine content of chocolate products. *J. Food Sci.*, **45**:314-16, 1980.

Recebido para publicação em 22/12/95

## TEOR DE IODO E CLASSIFICAÇÃO GRANULOMÉTRICA DO SAL CONSUMIDO NA ÁREA BOCÍGENA DE GOIÁS\*

Neusa Vitória Valério SILVEIRA\*\*  
Maria Auxiliadora de Brito RODAS\*\*  
Jacira Hiroco SARUWTARI\*\*  
Arlete de SOUZA\*\*  
Adauri RIBEIRO\*\*

RIALA6/797

SILVEIRA, N.V.V.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H.; SOUZA, A.; RIBEIRO, A. - Teor de iodo e classificação granulométrica do sal consumido na área bocígena de Goiás. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):65-70, 1996.

**RESUMO:** Os órgãos oficiais de fiscalização dos alimentos no Brasil têm a obrigatoriedade de controlar o teor de iodo no sal para proteger a população do bócio endêmico e suas conseqüências. Pretendeu-se verificar a efetiva iodação do sal comercializado na área bocígena de Goiás, pelo grande significado dos resultados da pesquisa no campo da saúde pública. Foi determinado o teor de iodo em 116 amostras de sal refinado e moído, de 24 marcas diferentes, colhidas na área bocígena de Goiás, no período de março de 1993 a junho de 1994. Foi também determinada a classificação quanto à granulometria nas mesmas amostras para verificar se estavam de acordo com a legislação vigente. Foram utilizados nesta pesquisa os métodos físico-químicos indicados nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Do total das amostras analisadas, 24 (20,7%) se encontravam com o teor de iodo abaixo de 10mg/Kg, em desacordo com a legislação vigente. Das 116 amostras, 45 (38,8%) se encontravam em desacordo com a legislação vigente em relação à granulometria; sendo destas, 11 (31,4%) de sal refinado e 34 (42,0%) de sal moído.

**DESCRIPTORIOS:** Sal refinado, sal moído, teor de iodo no sal, classificação granulométrica.

### INTRODUÇÃO

Pretendeu-se verificar a efetiva iodação do sal comercializado na área bocígena de Goiás. O estado de Goiás, situado em planalto e geograticamente longe do mar, é um dos mais prejudicados em relação à carência de iodo<sup>20</sup>.

O bócio é uma endemia que ainda constitui um sério problema de saúde pública no Brasil<sup>22</sup>. Os estudos feitos pelos técnicos especializados da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAM/MS, em inquérito realizado em 1955 e 1975, confirmou o problema de endemia no Brasil<sup>14</sup>.

Ainda que tenha havido sensível declínio desta doença, depois da iodação do sal de cozinha, em todo

o território nacional, com a criação da Resolução nº 25 de 30 de dezembro de 1957<sup>4\*</sup>, são necessários cuidados constantes para que não haja reaparecimento do bócio em larga escala como sucedeu em países centro-americanos<sup>24</sup>.

O bócio afeta o sistema nervoso central de maneira irreversível. O cretinismo é a sua mais séria conseqüência. A gestante acometida de bócio pode acarretar ao feto graves alterações no cérebro e no sistema neurológico<sup>1, 17, 20, 22, 23, 25, 26</sup>.

A deficiência de iodo na alimentação é fundamental na etiologia do bócio. A ação profilática do iodo contra o cretinismo é aceita sem restrições por todo o mundo<sup>22, 23</sup>. A utilização do sal como veículo tem se mostrado, mundialmente, como a forma mais econô-

\* Realizado no Instituto Adolfo Lutz, SP. Apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, no período de 17 a 20 de junho de 1994, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

mica, simples e abrangente, para a prevenção e controle da insuficiência do iodo no organismo humano e animal<sup>20,26</sup>.

Sabe-se que a recomendação diária de ingestão de iodo para população de zonas biocígenas é de 40 a 50 microgramas para lactentes, 70 a 120 microgramas para crianças e de 100 a 150 microgramas para adultos<sup>16</sup>. Entretanto, o limite atual exigido pela legislação brasileira é insuficiente na recuperação dos que sofrem de bócio.

A Organização Mundial de Saúde - OMS, recomenda como "ótimo" para programas de iodação, a adição de 40mg, com variação de 30 a 50 mg/Kg de iodo no sal<sup>1</sup>.

No Brasil, depois de editada a Lei nº 1944, de 14 de agosto de 1953 do Ministério da Educação e Saúde, tornou-se obrigatório a iodação do sal de cozinha apenas nas zonas biocígenas do país<sup>2,21</sup>. Esta lei teve sua regulamentação através do decreto nº 39814, de 16 de agosto de 1956<sup>3</sup>, que delimitou as áreas biocígenas do Brasil, mas ainda é preocupante a situação em algumas áreas<sup>14</sup>.

O Ministério da Saúde, em 1982, confiou ao Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição - INAN, e à Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAM, as atividades do Programa de Combate de Bócio Endêmico - PCBE. Mais tarde, a SUCAM passou a fazer parte da Fundação Nacional de Saúde - FNS, e estabeleceu o Subprograma de Iodação do Sal - SPIS<sup>15,18,21,26</sup>.

A partir de janeiro de 1983, foi reativado o trabalho de iodação de sal, onde o Ministério da Saúde introduziu novos procedimentos para maior eficácia no combate ao bócio endêmico<sup>21,25</sup>.

Foi editada a Portaria nº 3, de 23 de fevereiro de 1984 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - SNVS, que estabeleceu limites de 10 a 30mg de iodo metalóide por quilograma do sal refinado ou moído para o consumo humano<sup>8</sup>, considerando a margem técnica conveniente aos procedimentos industriais, complementando a Lei nº 6150, de 3 de dezembro de 1974<sup>5</sup>, que até então exigia exatamente 10mg de iodo metalóide por quilograma do produto. Outra medida foi a adoção de equipamentos para a iodação do sal que, embora simples e de baixo custo<sup>15</sup>, mostrou-se muito eficiente às moageiras que não dispunham de instalações adequadas para esse fim. Além do fornecimento do iodato às indústrias, para adição ao sal produzido, também foi prestado maior apoio às usinas salineiras com visitas de inspetores sanitários da Fundação Nacional de Saúde - FNS (ex-agentes da SUCAM), os quais orientavam na correta adição do iodato de potássio ao sal, regulando o equipamento necessário<sup>18,21</sup> e analisando amostras no local de produção.

Também são coletadas grande número de amostras a serem analisadas nos laboratórios oficiais. Neste sistema de trabalho, o relatório do ano de 1993<sup>24</sup>, mostra que foram efetuadas 17814 análises de sal no Brasil, um número bastante significativo para o bom controle de fiscalização.

Recentemente, o PCBE (Programa de Combate ao Bócio Endêmico) foi reestruturado pela Portaria nº 2165, de 29 de dezembro de 1994<sup>10</sup> e recebeu nova denominação, Programa Nacional de Combate aos Distúrbios por Deficiência de Iodo, PNCCDI. Esta portaria também estabeleceu linhas básicas para novas diretrizes no controle do bócio.

Em 16 março de 1995 foi editada a Lei nº 9005<sup>13</sup>, que altera as disposições da Lei nº 6150<sup>5</sup>, de 3 de dezembro de 1974. Altera também o inciso XXX do artigo 10 da Lei nº 6437<sup>7</sup>, de 20 de agosto de 1977 que atribui ao Ministério da Saúde o estabelecimento da proporção de iodo a ser adicionado ao sal. A falta no cumprimento da lei é também considerada como infração sanitária. Pela portaria nº 1806 de 24 de outubro de 1994<sup>9</sup>, o Ministério da Saúde tinha estabelecido o limite de 40 a 60mg de iodo metalóide por quilograma do sal como o mais recomendado nas zonas carentes.

É importante que o teor de iodo adicionado ao sal tenha um eficiente controle através dos órgãos oficiais de fiscalização, levantando dados sobre o teor de iodo nos sais consumidos em zonas biocígenas.

A outra proposta deste trabalho é a verificação da veracidade na classificação do tipo de sal declarado na rotulagem em relação à granulometria, em cumprimento ao Decreto nº 75697, de 6 de maio de 1975, que aprova padrões de identidade e qualidade para o sal destinado ao consumo humano, estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos - CNNPA, do Ministério da Saúde<sup>6</sup>.

## MATERIAL E MÉTODO

Foi feita a colheita dos sais pelos técnicos especializados da Fundação Nacional de Saúde - FNS - nas cidades índices de Goiás, que são aquelas que compõem os pontos críticos para testes de prevalência do bócio endêmico dentro da área biocígena, como: Nova Roma, Flores de Goiás, Cabeceiras de Goiás e Palmeiras de Goiás, no período de março de 1993 a junho de 1994.

Foram colhidas 116 amostras de sais de 24 marcas diferentes, rotuladas como refinados ou moídos e enviadas ao laboratório do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo. As amostras foram numeradas, homogeneizadas e classificadas quanto à granulometria, por tamis nº 18 (1,00 mm de abertura) e nº 20 (0,84 mm

de abertura), respectivamente para sais moídos e refinados, utilizando a técnica indicada nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>. Verificou-se se o tipo de sal declarado na rotulagem estava realmente dentro dos parâmetros exigidos pela legislação vigente<sup>6</sup>.

O teor de iodo foi dosado nas amostras em triplicata, na forma de iodato, utilizando solução padronizada de tiosulfato de sódio, conforme metodologia indicada nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados nas tabelas I e II, e gráficos I e II, respectivamente.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Conclui-se que parte dos produtores de sal não estão cumprindo a legislação vigente com relação à classificação granulométrica, rotulando sais moídos como refinados.

Quanto aos teores de iodo, não foram encontrados os resultados esperados. Uma das moageiras não está adicionando iodo ao sal. As demais, em algumas partidas, estão adicionando teores abaixo do limite mínimo exigido pela legislação em vigor, no período em que as amostras foram colhidas.

A Lei nº 9005, de 16 de março de 1995<sup>13</sup> do Ministério da Saúde, no seu Artigo 3º, manda suprir de iodo

TABELA 1

Distribuição das amostras analisadas quanto à granulometria em relação à legislação em vigor.

TIPO DE SAL	Nº DE AMOSTRAS	APROVADO*	CONDENADO**
Refinado	35	24 (68,6%)	11 (31,4%)
Moído	81	47 (58,0%)	34 (42,0%)
Total	116	71 (61,2%)	45 (38,8%)

\* Dentro dos parâmetros exigidos<sup>6</sup>

\*\* Fora dos parâmetros exigidos<sup>6</sup>

TABELA 2

Distribuição das amostras analisadas quanto ao teor de iodo em relação à legislação em vigor.

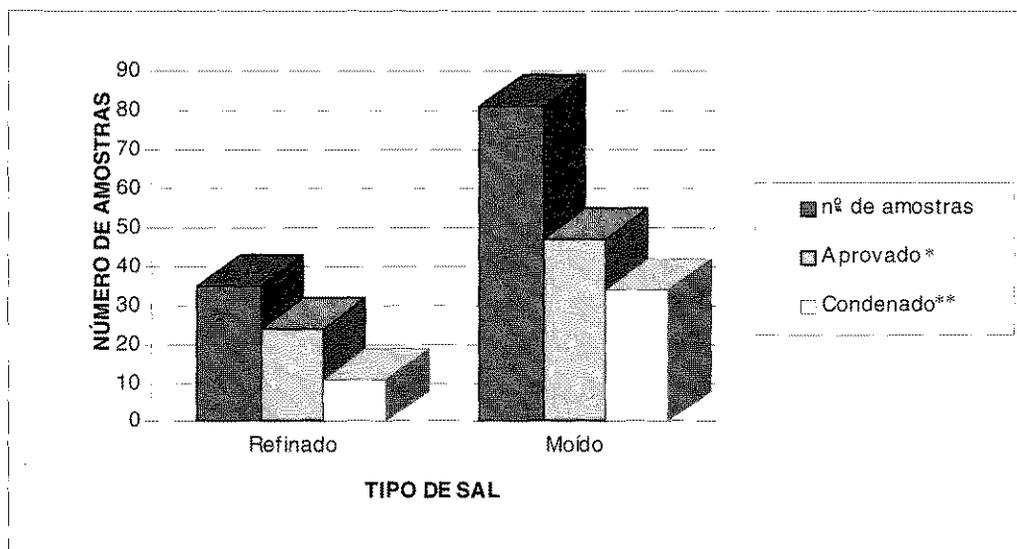
TIPO DE SAL	Nº DE AMOSTRAS	APROVADO*	CONDENADO**
Refinado	35	24 (68,6%)	07 (20,0%)
Moído	81	64 (79,0%)	17 (21,0%)
Total	116	92 (79,3%)	24 (20,7%)

\* Dentro dos parâmetros exigidos<sup>8</sup>

\*\* Fora dos parâmetros exigidos<sup>8</sup>

GRÁFICO I

Distribuição das amostras analisadas quanto à granulometria em relação à legislação em vigor

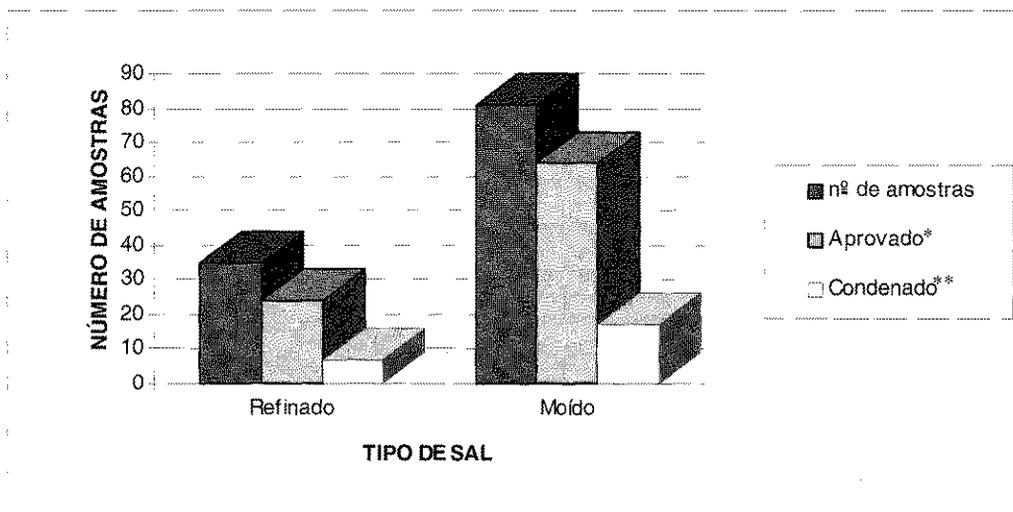


\* Dentro dos parâmetros exigidos<sup>6</sup>.

\*\* Fora dos parâmetros exigidos<sup>6</sup>.

GRÁFICO II

Distribuição das amostras analisadas quanto ao teor de iodo em relação à legislação em vigor



\* Dentro dos parâmetros exigidos<sup>6</sup>.

\*\* Fora dos parâmetros exigidos<sup>6</sup>.

as indústrias beneficiadoras de sal e convalida os atos praticados com base na Medida Provisória nº 834, de 19 de janeiro de 1995<sup>11</sup> e Medida Provisória nº 895, de 16 de fevereiro de 1995<sup>12</sup>.

Efetivamente, será necessário uma intensa fiscalização no local de beneficiamento do sal, para certeza de um produto final adequado.

#### AGRADECIMENTOS

Aos Srs. Coordenadores Regionais da Fundação Nacional de Saúde - FNS/Goiás: Dr. Paulo Gonçalves de Castro e Dr. Oscar Soares de Azevedo Jr., pelas amostras enviadas ao Laboratório do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

Ao colega José Inaldo Almeida Ribeiro pela colaboração técnica no presente trabalho.

RIALA6/797

SILVEIRA, N.V.V.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H.; SOUZA, A.; RIBEIRO, A. - Iodine content in salt in the goitrous area in Goiás and granulometric classification of samples. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):65-70, 1996.

**ABSTRACT:** The official food inspection agencies in Brazil are responsible for the iodine content control in the salt in order to protect the population against endemic goiter and its consequences. It was intended to verify the actual iodine content in the salt commercialized in a specific area in the state of Goiás, due to the results of field researches carried by public health agencies showing high occurrence of goiter. It was determined the iodine content in 116 samples of refined and ground salt of 24 different brands taken from that high goiter incidence area in Goiás during the period of March 1993 to June 1994. It was also determined the granulometric classification in the same samples to confirm whether they complied with the legislation in effect. Physical chemical methods indicated in the "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" were utilized in this research. From the whole of samples analyzed, 24 (20,7%), showed an iodine content below 10mg/Kg, conflicting with the legislation in force. From the 116 samples, 45 (38,8%) were not in compliance with the legislation in effect as to its granulometry, of which 11 (31,4%) being refined salt and 34 (42,0%) ground salt.

**DESCRIPTORS:** Refined salt, ground salt, iodine content in salt, granulometric classification in salt.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BÓCIO: UM PROBLEMA SÉRIO DE SOLUÇÃO SIMPLES. *Fome em debate*, Brasília, 1(3): Jan./Mar., 1968.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 1944, de 14 de agosto de 1953. *Diário Oficial*, p. 14345. Brasília, 20 de agosto de 1953.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 39814 de 17 de agosto de 1956. *Coleção das Leis*. Rio de Janeiro, Departamento de Imprensa Nacional, v.6, p.394, 1956.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 25/57 do Instituto Brasileiro do Sal. *Diário Oficial*, Seç.1, p. 29065, Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 1957.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Lei nº 6150 de 3 de dezembro de 1974. *Diário Oficial*, Seç.1, pt.1, p. 13733, Brasília, 4 de dezembro de 1974.
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 75697 de 6 de maio de 1975. *Diário Oficial*, Seç.1, pt.1, p.1145, Brasília, 7 de maio de 1975.
7. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 6437, de 20 de agosto de 1977. *Diário Oficial*, Seç.1, pt.1, p. 1145, Brasília, 24 de agosto de 1977.
8. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 03 de 23 de fevereiro de 1984, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial*, Seç.1, p. 2854. Brasília, 24 de fevereiro de 1984.
9. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 1806, de 24 de outubro de 1994, do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Seç.1, p. 16116, Brasília, 25 de outubro de 1994.
10. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 2165, de 29 de dezembro de 1994, do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Seç.1, p. 46-7, Brasília, 2 de janeiro de 1995.
11. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Medida Provisória nº 834, de 19 de janeiro de 1995. *Diário*

- Oficial*, Sec.1, p. 905, Brasília, 20 de janeiro de 1995.
12. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Medida Provisória nº 895 de 16 de fevereiro de 1995. *Diário Oficial*, Brasília, 17 de dezembro de 1995. Sec.1, p. 2143.
  13. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Lei nº 9005 de 16 de março de 1995. *Diário Oficial*, Sec.1, p. 3594, Brasília, 17 de março de 1995.
  14. COSTA, Z.G.A.; TAVARES, V.J. - *Programa de Combate ao Bócio Endêmico*. Atualização do trabalho iniciado pela Divisão Nacional de Endemias Rurais em 1968. INAN/SUCAM, 30p., 1989.
  15. CURSO-TALLER SOBRE DESORDENS POR DEFICIÊNCIA DE YODO Y SU CONTROL EN AMERICA LATINA, 1º, Quito, 1990. Situacion actual de DDI en Latinoamerica. *Resumem del Seminario*. Quito, Ministério de la Salud Publica/Agencia de Cooperation para el Dessarrollo, AGCD-Bélgica/OMS/OPS/UNICEF, s.d. (Proyecto "Lucha Operacional Contra el Bocio Endemico en el Ecuador").
  16. DELLAVALLE, M.E.; BARBANO, D.N. - Iodine content of milk and other foods. *J. Food Protect.* 47(9): 678-84, 1984.
  17. DUNN, J.; VAN DER HAAR, F. - *Guia Prático para Correção de Carência de Iodo*. Conselho Internacional para o Controle das Perturbações Provocadas pela Carência de Iodo, Wageningen, Holanda/ICCIDD/UNICEF/OMS, 1992.
  18. ESTUDO DA IODATAÇÃO DO SAL. *Relatório Final*. Consultor: John Thomas Lopategui, Brasília, 1993.
  19. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. 3ª ed., São Paulo, IMESP, p. 284, 288, 1985.
  20. INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. Programa de Combate ao Bócio Endêmico. *Manual de Combate à Carência de Iodo*. Brasília, INAN/FNS, 1992.
  21. MEDEIROS NETO, G.A. - Towards the eradication of iodine deficiency disorders in Brazil through salt iodination programme. *Bull. OMS*, 66(5): 637-42, 1981.
  22. MEETING OF THE PAHO SCIENTIFIC GROUP ON RESEARCH IN ENDEMIC GOITER, 3ª, Puebla, Mexico, 1968 - *Endemic goiter report*. J.B.STAMBURY, Washington, D.C., PAHO, 1969. (PAHO Scientific Publ., nº 193).
  23. MEETING OF THE PAHO/WHO TECHNICAL GROUP ON ENDEMIC GOITER, CRETINISM AND IODINE DEFICIENCY, 5ª, Lima, 1983. J.T.DUNN et alii. Toward the eradication of endemic goiter cretinism and iodine deficiency: proceedings. Washington, D.C., PAHO, 1986 (PAHO Scientific Publ. nº 502).
  24. SEMINÁRIO DE COMBATE ÀS DEFICIÊNCIAS DE MICRONUTRIENTES NO BRASIL, Brasília, 1993. *Relatório Final*. Consultores: Malaquias Batista Filho e Alcides da Silva Diniz. Brasília, INAN/OPAS, 11p., 1993.
  25. SILVEIRA, N.V.V.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H.; SOUZA, A. - Estabilidade do teor de iodo no sal após tempo de prateleira e cocção. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 41-5, 1993.
  26. STAMBURY, J.B.; ERMANS, A. M.; HETZEL, B.S.; PRETEL, E.A.; QUERIDO, A. - Importância sanitária y prevención del bócio endémico y del cretinismo. *Cronica OMS*, 28:246-55, 1974.

Recebido para publicação em 27/04/95

## RELATO DE SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR PROVOCADA POR CONSUMO DE BOLO CONTAMINADO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IMPORTÂNCIA DA HIGIENE DOS MANIPULADORES E CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO DO ALIMENTO NA PREVENÇÃO DA DOENÇA

Maria Helena C.R.PASSOS\*  
Arnaldo Y. KUAYE\*\*

RIALA6/798

PASSOS, M.H.C.R. e KUAYE, A.Y. - Relato de Surto de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 56(1):71-76, 1996.

**RESUMO:** Este trabalho relata um surto de intoxicação alimentar ocorrido em março de 1994 na cidade de Santa Bárbara D'Oeste-SP (Brasil). O alimento envolvido foi bolo recheado e confeitado, contaminado por *Staphylococcus aureus* ao nível de  $2,9 \times 10^9$  UFC/g. Baseado no inquérito epidemiológico realizado e na elevada contaminação, concluiu-se que *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo patogênico responsável pelo surto. Os fatores que, possivelmente, contribuíram para a ocorrência do surto, higiene inadequada dos manipuladores e manutenção do alimento à temperatura ambiente por longo intervalo de tempo, são discutidos.

**DESCRIPTORIOS:** Intoxicação alimentar estafilocócica, Bolo, Manipulação higiênica de alimentos, Condições de conservação de alimentos.

### INTRODUÇÃO

A intoxicação alimentar provocada por *Staphylococcus aureus* é devida à ingestão de neurotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento. A síndrome é caracterizada por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, e por um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado. Embora seja verificada prostração em casos severos, o doente recupera-se completamente dentro de 1 a 3 dias e, raramente, ocorrem mortes<sup>21</sup>.

O período de incubação e a severidade dos sintomas depende da quantidade de enterotoxina ingerida e da suscetibilidade do indivíduo. Níveis de enterotoxina variando de 0,01 a 0,4 µg por grama do alimento já são suficientes para provocar a intoxicação, en-

quanto que a ingestão de quantidades inferiores a 1 µg é capaz de afetar indivíduos mais sensíveis<sup>5,9</sup>. Para se atingir tais níveis de enterotoxina é necessária, segundo ICMSF<sup>12</sup>, uma intensa proliferação do agente patogênico no alimento, até que números superiores a  $10^6$ /g sejam alcançados.

Mesmo em países desenvolvidos, onde são realizados levantamentos epidemiológicos sobre enfermidades transmitidas por alimentos, não se tem um real conhecimento do grau de incidência de intoxicação estafilocócica. Um grande número de surtos não é notificado, devido, provavelmente, à curta duração e à evolução benigna da doença; apenas aqueles envolvendo um número elevado de pessoas, por exemplo: em casamentos e aniversários, chegam ao conhecimento e são investigados pelas autoridades de saúde pública<sup>24</sup>.

\* Eng<sup>B</sup> de Alimentos, doutoranda em Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Caixa Postal 6121 - 13.081-970 - Campinas, SP - Brasil.

\*\* Prof. do Depto. de Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Caixa Postal 6121 - 13.081-970 - Campinas, SP - Brasil. (Autor indicado para troca de correspondências)

Apesar deste fato, *Staphylococcus aureus* tem sido reportado como um dos principais agentes etiológicos de doenças de origem alimentar na Inglaterra e País de Gales, Austrália e Canadá<sup>6,18,23</sup>.

Nos Estados Unidos, segundo BEAN & GRIFFIN<sup>2</sup>, este microrganismo foi responsável por 13% dos surtos de enfermidade alimentar notificados entre 1973 e 1987. Nesse período, observou-se um decréscimo na incidência dos surtos devidos a *Staphylococcus aureus*. Entretanto, baseados na existência de um elevado número de surtos com etiologia desconhecida, cujo período de incubação e sintomatologia eram típicos de intoxicação estafilocócica, os autores sugeriram que *Staphylococcus aureus* continuava sendo um importante agente causal de doenças de origem alimentar naquele país.

No Brasil, uma vez que as doenças veiculadas por alimentos não são de notificação compulsória, as informações sobre a ocorrência de surtos de intoxicação estafilocócica limitam-se a escassos relatos na literatura<sup>8,9,13,15,16,19,20,22</sup>.

Este trabalho relata a investigação de um surto de intoxicação estafilocócica causada pela ingestão de bolo recheado e confeitado, abordando os fatores que, possivelmente, foram responsáveis pela sua ocorrência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Notificação do Surto*

Em março de 1994, a Vigilância Sanitária da DIR XII - Campinas - foi notificada pela Secretaria Municipal de Saúde de Santa Bárbara D'Oeste (SP) de um provável surto de enfermidade alimentar ocorrido entre os convidados de uma festa de aniversário.

Segundo informações colhidas, cerca de 50 pessoas estiveram presentes à festa, das quais, aproximadamente, 30 adoeceram. O bolo, preparado em uma padaria da cidade, foi incriminado pelos próprios convidados como alimento suspeito, baseado no fato de que três pessoas acometidas pela doença haviam ingerido apenas este alimento. A amostra do bolo foi mantida sob refrigeração, aguardando encaminhamento ao laboratório para análise.

### *Investigação do Surto*

Após a notificação, a equipe de vigilância sanitária deslocou-se para o local, a fim de proceder a investigação do surto.

### *Inquérito Epidemiológico*

Na pesquisa epidemiológica foram entrevistados 23 convidados (46,0% do total de expostos, considerado como sendo 50), utilizando-se o formulário de inqué-

rito coletivo recomendado pela Secretaria de Estado da Saúde<sup>21</sup>.

### *Colheita e Encaminhamento da Amostra para Análise*

Procedeu-se a colheita da amostra do bolo, sendo a mesma convenientemente transportada para o Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Campinas, para ser submetida à análise microbiológica. A pesquisa de *Staphylococcus aureus* no alimento foi realizada segundo a metodologia recomendada pela APHA<sup>1</sup>.

### *Inspecção Sanitária do Estabelecimento e Avaliação dos Manipuladores*

Na inspeção sanitária da padaria, procurou-se avaliar aspectos higiênicos e de conservação das instalações, equipamentos e utensílios, estado de saúde e higiene pessoal dos empregados, bem como as condições de manipulação e manutenção dos alimentos prontos para consumo. Buscou-se também levantar o histórico do alimento suspeito da enfermidade alimentar.

Os manipuladores foram encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Campinas, a fim de ser coletado material para análise clínica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Avaliação do Inquérito Epidemiológico*

O inquérito epidemiológico realizado permitiu a obtenção do número de expostos e o número de doentes para cada alimento, possibilitando o cálculo da taxa de ataque. Na Tabela 1 pode ser observado que, entre os alimentos servidos na festa de aniversário: cachorro-quente, bolo recheado e confeitado, sorvete, brigadeiro, bombom e refrigerante, o bolo apresentou a maior taxa de ataque entre os indivíduos que ingeriram o alimento (88,9%) e a menor taxa de ataque entre os que não ingeriram (0%), o que incrimina este alimento como suspeito pelo surto.

Os sintomas predominantes, levantados através de entrevista com 16 doentes, foram: vômitos (87,5%), diarreia (62,5%), dores abdominais (37,5%) e náuseas (18,8%). Quinze pessoas necessitaram de atendimento médico, tendo sido ministrado Plasil e Buscopan.

Verificou-se que o período de incubação mais curto foi de 3 horas e o mais longo 7 horas, situando o período médio em torno de 4 horas e a mediana em 3 horas e 45 minutos.

### *Análise Microbiológica do Alimento*

O resultado da análise microbiológica do bolo demons-

TABELA 1

Taxa de ataque específica segundo o alimento envolvido.

ALIMENTOS	COMERAM			NÃO COMERAM				
	DOENTES SÃOS	TOTAL	TAXA ATAQUE (%)	DOENTES SÃOS	TOTAL	TAXA ATAQUE (%)		
Cachorro-quente	12	05	17	70,6	04	02	06	66,7
Bolo recheado e confeitado	16	02	18	88,9	0	05	05	0
Sorvete	13	04	17	76,5	03	03	06	50,0
Brigadeiro	11	05	16	68,8	05	02	07	71,4
Bombom	07	04	11	63,6	09	03	12	75,0
Refrigerante	12	06	18	66,7	04	01	05	80,0

Fonte: Inquérito Epidemiológico.

trou a contaminação do alimento por *Staphylococcus aureus* a um nível de  $2,9 \times 10^6$  UFC/g.

Assim, baseado no inquérito epidemiológico e no resultado da análise do alimento, pode-se concluir que a intoxicação foi causada por bolo contaminado com *Staphylococcus aureus*.

Os produtos de confeitaria, principalmente os recheados, figuram entre os alimentos mais frequentemente implicados em surtos de intoxicação estafilocócica<sup>2,8,10,11,13,16,24</sup>.

#### Avaliação das Condições Gerais de Higiene e Práticas de Processamento

Neste trabalho, a inspeção sanitária da padaria onde o bolo foi preparado revelou que pisos, paredes, equipamentos e utensílios encontravam-se em bom estado geral de conservação e limpeza. Os dois manipuladores, aparentemente, gozavam de boa saúde, não tendo sido constatada a presença de feridas em suas mãos ou braços. As condições de higiene na manipulação não puderam ser avaliadas, pois no momento da inspeção nenhum alimento estava sendo preparado. As matérias-primas eram mantidas de forma adequada, enquanto que produtos como doces e bolos recheados, apesar de expostos a venda em local limpo, eram mantidos à temperatura ambiente, prática esta comum na comercialização deste tipo de alimento.

O bolo responsável pela intoxicação alimentar, recheado com doce de leite e ameixas e recoberto com glacê e côco, foi preparado no dia da festa, entre 6:30 e 7:30h da manhã, e entregue por volta das 10:00h, tendo permanecido exposto à temperatura ambiente

desde o preparo até o consumo, aproximadamente às 16:00h desse mesmo dia.

A análise do material clínico coletado no leito subungueal, fossa nasal e região orofaríngea dos 2 manipuladores revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* nos 3 sítios estudados.

Uma vez que não foi realizada análise para detecção e identificação de enterotoxinas no alimento, e não foi testada a enterotoxigenicidade das cepas isoladas dos manipuladores, não foi possível incriminar conclusivamente o(s) manipulador(es) como fonte de contaminação do alimento. Entretanto, esta possibilidade não pode ser descartada.

Outro fato relevante, refere-se ao tempo de manutenção do bolo à temperatura ambiente, cerca de 8 horas e meia, o que, provavelmente, permitiu uma intensa proliferação do microrganismo no alimento, provocando assim a intoxicação estafilocócica.

Embora *S. aureus* possa ser isolado de carnes, aves e leite crus, manipuladores portadores de cepas enterotoxigênicas representam a principal fonte de contaminação de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica<sup>3,4,18</sup>.

Segundo TRANTER<sup>24</sup>, 20 a 50% das pessoas em pleno estado de saúde são portadoras de *S. aureus*, sendo as fossas nasais o principal reservatório do microrganismo no homem. Os portadores nasais podem, através do mecanismo de auto-infecção, contaminar as mãos.

Os hábitos higiênicos praticados pelos manipuladores desempenham, portanto, um papel de grande

importância para a sanidade dos produtos, principalmente para os alimentos sujeitos a uma intensa manipulação durante o seu preparo.

Segundo BRYAN<sup>3</sup>, estão, geralmente, implicados em surtos de intoxicação estafilocócica os alimentos cozidos ou assados que, em seguida, são cortados, fatiados, recheados, ou de qualquer outro modo manipulado por pessoas portadoras de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus*.

Considerando os múltiplos fatores que podem estar envolvidos em um surto de intoxicação estafilocócica, BEAN & GRIFFIN<sup>2</sup> constataram que a higiene pessoal inadequada dos manipuladores estava envolvida em 71% dos surtos relatados nos Estados Unidos no período de 1973 a 1987. Neste mesmo período, este fator foi implicado em 67% dos surtos provocados por produtos de confeitaria.

Trabalhos realizados no Brasil têm demonstrado a existência de manipuladores portadores de *S. aureus* e a contaminação de alimentos por este microrganismo durante a manipulação<sup>4,17</sup>. No rastreamento epidemiológico de um surto de intoxicação estafilocócica provocada por bolo recheado e confeitado, PEREIRA et alii<sup>16</sup> constataram que a manipuladora havia sido a fonte de contaminação do alimento.

Segundo EIROA<sup>7</sup>, a mão-de-obra captada no mercado para desempenho do trabalho de elaboração de alimento é, muitas vezes, proveniente da classe de baixo nível sócioeconômico, que enfrenta no seu dia-a-dia privações das mais variadas, morando em sub-habitações na periferia dos centros urbanos, em condições precárias de higiene e saúde. O fator sócioeconômico, além de dificultar o controle médico de saúde destes funcionários, impõe sérias limitações na transmissão de conhecimentos técnicos e de higiene.

Assim sendo, no Brasil, apesar da falta de dados epidemiológicos, a higiene pessoal inadequada dos manipuladores pode ser um fator mais freqüentemente envolvido na contaminação de alimentos veiculadores de intoxicação estafilocócica, do que o observado nos países desenvolvidos.

Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1987, a manutenção de alimentos a temperaturas inadequadas esteve envolvida em 98% dos surtos de intoxicação estafilocócica. Com relação aos produtos de confeitaria, este fator foi responsabilizado em 73% dos surtos de enfermidade alimentar relatados<sup>2</sup>.

No Brasil, onde normalmente são registradas temperaturas máximas e mínimas bastante elevadas, principalmente durante o verão, a manutenção de alimentos sem refrigeração por um longo período de tem-

po representa um risco potencial para a ocorrência de surtos de enfermidade alimentar. A combinação destes dois fatores (manutenção à temperatura ambiente e tempo prolongado entre o preparo e o consumo do alimento) tem mostrado ser de grande importância em surtos de intoxicação estafilocócica relatados<sup>13,16</sup>, uma vez que tais condições propiciam uma intensa multiplicação do microrganismo no alimento, com conseqüente liberação de enterotoxinas em níveis suficientes para desencadear o processo patológico.

## CONCLUSÕES

O inquérito epidemiológico efetuado e o resultado da análise microbiológica do alimento permitem concluir que a intoxicação foi provocada por bolo, recheado e confeitado, contaminado com *Staphylococcus aureus*.

A contaminação do alimento, possivelmente, ocorreu através da manipulação, enquanto que as condições de conservação do bolo e o tempo transcorrido desde o preparo até o consumo, provavelmente, possibilitaram uma intensa multiplicação do microrganismo, tornando o alimento potencialmente capaz de provocar intoxicação.

Os hábitos higiênicos praticados pelos manipuladores e as condições de temperatura e tempo a que o alimentos ficam expostos até seu consumo desempenham, sem dúvida alguma, papel de destaque na epidemiologia das intoxicações estafilocócicas.

Assim, o desenvolvimento de programas educativos destinados a proprietários, manipuladores e consumidores, em que os preceitos de higiene pessoal e as práticas adequadas de manipulação e conservação de alimentos sejam tratados de forma acessível e facilmente assimilável, inevitavelmente contribuirá para a prevenção desta doença.

## AGRADECIMENTOS

À Vigilância Sanitária da DIR XII - Campinas, responsável pela realização do inquérito epidemiológico e inspeção sanitária do estabelecimento.

Ao Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Campinas, responsável pela realização da análise microbiológica do alimento e análise clínica dos manipuladores.

RIALA6/798

PASSOS, M.H. e KUAYE, A.Y. - FOOD-POISONING DUE TO CAKE CONTAMINATED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. Importance of the hygiene of foodhandlers and holding conditions for the disease prevention. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):71-76, 1996.

ABSTRACT: This work report an outbreak of food poisoning which occurred in March, 1994, in the city of Santa Bárbara D'Oeste, State of São Paulo, Brazil. The food involved was an icing-covered and custard-filled cake, contaminated by *Staphylococcus aureus* at a level of  $2,9 \times 10^9$  UFC/g. Based on the epidemiologic investigation and high contamination it was concluded that *Staphylococcus aureus* was the pathogen responsible for the outbreak. The possible factors which contributed to the occurrence of the outbreak, poor hygienic practices of foodhandlers and holding of food at room temperature, will be discussed.

DESCRIPTORS: Staphylococcal food-poisoning, cake, hygienic foodhandling, holding conditions of foods.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3<sup>rd</sup> ed., Washington, D.C., C. Vanderzant & D.F. Splittstoesser, ed., 1992.
2. BEAN, N.H. & GRIFFIN, P.M. - Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Prot.*, **53**(9): 804-817, 1990.
3. BRYAN, F.L. - Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *J. Food Prot.*, **41**(10):816-827, 1978.
4. BRYAN, F.L. - Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J. Food Prot.*, **51**(8) 663-673, 1988.
5. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. - Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, **13**(2): 181-189, 1965.
6. DAVEY, G.R. - Food poisoning in New South Wales: 1977-84. *Food Technol. Australia*, **37**(10):453-456, 1985.
7. EIROA, M.N.U. - Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causados por alimentos processados. *Col. ITAL*. **19**(2):101-112, 1989.
8. GELLI, D.S.; TANAKA, A.Y.; ROCHA, M.M.M.; PISANI, B.; FREITAS, A.; ESPER, M.R.N.R.; RIBEIRO, E.G.A.; KAKU, M.; PACHECO, M.A.S.R.; CASTRO, M.T.F.; VICENTE, M.P. - Intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 15<sup>o</sup>. Ribeirão Preto, 1989. *Rev. Microbiol.*, **20**(Supl. 1) :57, 1989.
9. GILBERT, R.J.; WIENEKE, A.A.; LANSER, J.; SIMKOVIUOVÁ, M. - Serological detection of enterotoxin in foods implicated in staphylococcal food poisoning. *J. Hyg.*, **70**(4):755-762-1972.
10. GUILHERME, E.F.M.; SOARES, V.L.P.; SILVA, C.L.O.; CRUZ, E.C.S.; OTTO, S.S. - Surtos de toxinfecção de origem alimentar ocorridos na Cidade do Rio de Janeiro. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 14<sup>o</sup>. São Paulo, 1994. *Resumos*. São Paulo, p. 129, 1994.
11. IARIA, S.T. & NASCIMENTO, D. - Estudo microbiológico de doces cremosos, vendidos comercialmente na Cidade de São Paulo. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 7<sup>o</sup>, Fortaleza, 1984. *Resumos*. Fortaleza, p.200, 1984.
12. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). - *Microorganisms in Foods*. I. Their significance and methods of enumeration, 2 ed, University of Toronto Press, Toronto, Canada, p.28-32, 1978.
13. KARINO, E.H.; OKADA, C.; PAULA, C.J.; DOSSI, A.; MUTTA, T.; CASADO, N.Y.A.; MATOS, N.M. Relato de um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*, em Paranavaí. *PR.Hig. Alim.*, **4**(2):102-105, 1985.
14. PENNA, T.C.V.; ABE, L.E.; MACHOSHVILI, I.A.; COLOMBO, A.J.; BARUFFALDI, R. - Controle de qualidade no processamento de

- alimentos em restaurante industrial. *Bol. Centro Pesq. Proces. Alimentos*, 7(1):62-69, 1989.
15. PEREIRA, M.L.; LARA M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. - Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo tipo "Minas". *Rev. Microbiol.*, 22(4):349-350, 1991.
16. PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; BERGDOLL, M.S. - Intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* em Belo Horizonte-MG-Rastreamento epidemiológico do surto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 14º, São Paulo, 1994. *Resumos*. São Paulo, p. 144, 1994.
17. RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. - *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Rev. Saúde Públ.* 22(1) 36-40, 1988.
18. ROBERTS, D. - Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970-1979. *J.Hyg.*, 89(3):491-498, 1982.
19. SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. - Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Rev. Saúde Públ.*, 22(5): 458-461, 1988.
20. SABIONI, J.G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J.L. - Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG), 1992. *Hig. Alim.*, 8(33):22-23, 1994.
21. SÃO PAULO. - Secretaria de Estado da Saúde. Gabinete do Secretário. Centro de Vigilância Sanitária. Divisão Técnica de Produtos. Sistema VETA: sistema de vigilância de enfermidades transmitidas por alimentos versão 01. São Paulo, 96p., 1994. (Adaptação do Guia VETA - 1993 da Organização Panamericana de Saúde - OPAS).
22. SILVA, K.R.A.; ROSADO, A.S.; SEIXAS R.L.R.; MIGUEL, M.A.L.; TÓRTORA, C.O. - *Staphylococcus aureus* - intoxicação alimentar de uma família no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 15º. Ribeirão Preto, 1989. *Rev. Microbiol.*, 20(Supl 1): 56, 1989.
23. TODD, E.C.D. - Foodborne and waterborne disease in Canadá - 1979. Annual summary. *J. Food Prot.* 48(12):1071-1078, 1985.
24. TRANTER, H.S. - Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness. *Lancet*, 336(8722): 1044-1046, 1990.

Recebido para publicação em 14/06/95

## AVALIAÇÃO DOS SURTOS DE ENFERMIDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS COMPROVADOS LABORATORIALMENTE NO MUNICÍPIO DE CAMPINAS - SP - NO PERÍODO DE 1987 A 1993

Predomínio da Ocorrência de Surtos em Serviços de Alimentação e Agentes Etiológicos Envolvidos

Maria Helena C.R.PASSOS\*

Arnaldo Y. KUAYE\*\*

RIALA6/799

PASSOS, M.H.C.R. e KUAYE, A.Y. - Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas - SP - no período de 1987 a 1993. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):77-82, 1996.

**RESUMO:** No período de 1987 a 1993, a Vigilância Sanitária Municipal investigou 53 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos na cidade de Campinas-SP (Brasil), sendo que em 19 deles houve comprovação laboratorial. Alimentos preparados em serviços de alimentação foram implicados em 14 (73,6%) surtos, enquanto que alimentos preparados em residências e padarias/confeitarias foram responsáveis, respectivamente, por 3(15,8%) e 2(10,5%) surtos. Os resultados mostraram que *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foram os agentes etiológicos responsáveis, respectivamente, por 68,4 e 31,6% do total de surtos. *Bacillus cereus* foi incriminado em 78,6% e *S. aureus* em 21,4% dos surtos relacionados com serviços de alimentação. A relevância destes microrganismos como agentes etiológicos de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos e os principais fatores que contribuem para a ocorrência de tais incidentes são discutidos neste trabalho.

**DESCRITORES:** Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, Serviços de alimentação, Agentes etiológicos.

### INTRODUÇÃO

A despeito do profundo conhecimento adquirido sobre a etiologia da maior parte das doenças de origem alimentar, elas continuam a ocorrer de maneira significativa, mesmo em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, segundo estimativas de SNYDER<sup>23</sup>, os casos de doenças de origem alimentar alcançam anualmente um número de vinte e cinco milhões, ocorrendo dezesseis mil mortes.

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de doenças. Entretanto, são os microrganismos, principalmente as bactérias, os principais promotores de doenças de origem alimentar. Nos Estados Unidos, no período de 1973 a 1987, as bactéri-

as foram responsáveis por 66% dos surtos e 87% dos casos de doenças de origem alimentar<sup>3</sup>.

As enfermidades transmitidas por alimentos de origem bacteriana são caracterizadas, na maioria das vezes, por manifestações gastroentéricas, podendo ser acompanhadas de febre, calafrios, cefaléia, entre outros sintomas.

Já há algumas décadas, têm-se observado uma tendência progressiva para o consumo de refeições fora do lar, o que promoveu o crescimento dos serviços de alimentação<sup>8</sup>. Assim sendo, as enfermidades alimentares, que antigamente envolviam

\* Eng<sup>a</sup> de Alimentos, doutoranda em Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Caixa Postal 6121 - 13.081-970 - Campinas, SP - Brasil.

\*\* Prof. do Depto. de Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Caixa Postal 6121 - 13.081-970 - Campinas, SP - Brasil. (Autor indicado para troca de correspondências)

um número reduzido de casos, geralmente limitados ao âmbito familiar, passaram a se manifestar de maneira mais dramática, saindo dos limites do lar para atingir um número maior de indivíduos<sup>11</sup>.

No Brasil, não existem dados epidemiológicos sobre a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos. Além do fato destas doenças não serem obrigatoriamente notificadas, concorrem negativamente para esta situação, entre outros, a falta de pessoal técnico preparado nos locais onde ocorrem surtos de enfermidade alimentar e a atitude bastante freqüente dos responsáveis pelos locais onde tais incidentes acontecem, de tratar de minimizar a importância do fato, procurando sufocá-lo imediatamente para evitar manifestações incômodas<sup>11</sup>.

Apesar de ser amplamente reconhecido que locais onde se prepara grande número de refeições estão mais sujeitos à ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos, no Brasil, os relatos envolvendo serviços de alimentação são escassos<sup>7,16,17,20,21,23,26</sup>.

Considerando a importância da divulgação de tais acontecimentos, este trabalho tem por objetivo avaliar e informar sobre surtos de enfermidade alimentar investigados no município de Campinas-SP, no período de 1987 a 1993, enfatizando a ocorrência em serviços de alimentação e os agentes etiológicos envolvidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Na elaboração deste trabalho foram utilizados inquéritos epidemiológicos realizados pela equipe de Vigilância Sanitária do município de Campinas-SP - e laudos emitidos pelo Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas. As análises microbiológicas dos alimentos foram realizadas segundo a metodologia recomendada pela APHA<sup>2</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 1987 a 1993, em Campinas-SP - foram investigados 53 surtos de enfermidade alimentar. Entretanto, em apenas 19(35,8%) houve comprovação laboratorial, tendo sido identificado o alimento envolvido e o agente etiológico em dose infectante.

### *Local de Preparo dos Alimentos Envolvidos nos Surtos*

Segundo UNKLESBAY et alii, citado por CHIPLEY & CREMER<sup>8</sup>, estabelecimentos de serviço de alimentação são instalações onde são fornecidas grandes quantidades de alimentos prontos para o consumo.

Assim sendo, conforme pode ser observado na Tabela 1, em Campinas, no período de 1987 a 1993, estabelecimentos de serviço de alimentação (restaurantes de coletividade, serviços de nutrição e dietética hospitalares e restaurantes comerciais) foram os locais de preparo de alimentos envolvidos em 73,6% dos surtos elucidados.

Este resultado concorda com levantamentos realizados em diversos países. No Canadá, Inglaterra/País de Gales e Austrália, em diferentes períodos estudados, alimentos preparados em estabelecimentos de serviço de alimentação foram responsáveis, respectivamente, por 57, 67 e 68% dos surtos de enfermidade alimentar<sup>5,9,25</sup>. Nos Estados Unidos, os surtos de enfermidade bacteriana envolvendo alimentos preparados em estabelecimentos comerciais ou institucionais aumentaram de 63%, entre 1973 e 1975, para 80%, entre 1985 e 1987<sup>3</sup>.

Segundo BRYAN<sup>6</sup>, nos Estados Unidos, no período de 1973 a 1982, os principais fatores responsáveis pela ocorrência de surtos em estabelecimentos de serviço de alimentação foram: resfriamento inadequado de alimentos, período de tempo igual ou superior a 12 horas entre o preparo e o consumo do alimento,

TABELA 1

Local de preparo dos alimentos envolvidos em surtos de enfermidade alimentar ocorridos em Campinas-SP - no período de 1987 a 1993.

LOCAL DE PREPARO	SURTOS	
	NÚMERO	PORCENTAGEM
Restaurantes de coletividade	10	52,6
Serviços de nutrição e dietética hospitalares	02	10,5
Restaurantes comerciais	02	10,5
Residências	03	15,8
Padarias / confeitarias	02	10,5

manipulação do alimento por pessoas infectadas, tempo e/ou temperatura inadequada de reaquecimento, temperaturas insuficientemente altas durante a manutenção de alimentos quentes e utilização de alimentos crus ou ingredientes contaminados. Entretanto, o autor ressalta que a maior ou menor importância destes fatores para a ocorrência de surtos depende do agente etiológico envolvido.

#### *Microorganismos e Alimentos Incriminados*

Dos 19 surtos de enfermidade alimentar confirmados laboratorialmente em Campinas entre 1987 e 1993, *Bacillus cereus* foi o agente etiológico responsável pela ocorrência de 13 surtos (68,4%). Esta bactéria foi incriminada em 78,6% dos surtos relacionados com serviços de alimentação. Observa-se

na Tabela 2 a variedade dos alimentos envolvidos nestes incidentes.

A alta incidência de *Bacillus cereus* como agente etiológico de surtos de enfermidade alimentar parece ser supreecedente; entretanto, os dados disponíveis na literatura mostram que, embora esta bactéria seja considerada, em alguns países, um agente de menor relevância na etiologia de doenças de origem alimentar, em outros, *Bacillus cereus* aparece entre os principais microorganismos responsáveis por estas doenças.

Nos Estados Unidos, no período de 1973 a 1987, *Bacillus cereus* foi responsável por 2% dos surtos e 1% dos casos de doenças de origem alimentar, estando freqüentemente envolvidos alimentos típicos chineses, principalmente arroz frito, e pratos típicos mexicanos<sup>3</sup>.

TABELA 2

Agentes etiológicos, locais de preparo e alimentos envolvidos nos surtos de enfermidade alimentar ocorridos em Campinas - SP - no período de 1987 a 1993.

AGENTE ETIOLÓGICO	LOCAL DE PREPARO	ALIMENTO ENVOLVIDO	NÚMERO DE SURTOS
	restaurantes de coletividade	arroz cozido	02
		canjica preparada	01
		farofa	01
		carne assada com molho	03
		almôndegas ao molho	01
		panqueca de carne com molho	01
<i>Bacillus cereus</i>	serv. nutr. diet. hospitalares	arroz cozido	01
	restaurantes comerciais	maionese de legumes	01
	padarias	pão-doce	01
	confeitarias	torta de uva	01
			13
	restaurantes de coletividade	maionese de legumes	01
	serv. nutr. diet. hospitalares	macarrão cozido	01
<i>Staphylococcus aureus</i>	restaurantes comerciais	lasanha à bolonhesa	01
	residências	bolo recheado	02
		maionese de legumes	01
			06

Na Austrália, entre 1977 e 1984, *Bacillus cereus* esteve implicado em 39% dos incidentes de doenças de origem alimentar, envolvendo principalmente pratos típicos da culinária oriental, particularmente arroz frito<sup>9</sup>. Este mesmo tipo de alimento esteve envolvido em 45 dos 52 surtos de enfermidade alimentar provocados por *Bacillus cereus* na Inglaterra/País de Gales, entre 1970 e 1979<sup>25</sup>.

Trabalhos conduzidos na Hungria, no período de 1960 a 1968, segundo HOBBS<sup>14</sup> e GOEPFERT e alii<sup>13</sup>, revelaram que, do total de surtos causados por *Bacillus cereus*, 53,8% envolviam produtos cárneos, principalmente pratos bem condimentados, 10,6% vegetais, 9,6% leite e cacau e 17,7% envolviam outros alimentos.

Desde a década de 60, a incidência de surtos devidos a *Bacillus cereus* tem sido particularmente alta na Holanda, Finlândia, Hungria e Canadá. Na Inglaterra/País de Gales, de 1986 a 1988, o número de casos de enfermidade alimentar provocados por *Bacillus spp.* aumentou mais de seis vezes, sendo *Bacillus cereus* responsável pela maior parte deles<sup>18</sup>.

Vários trabalhos realizados no Brasil têm demonstrado a presença freqüente de *Bacillus cereus* em alimentos como: produtos da merenda escolar, alimentos desidratados, frutas e hortaliças, carnes e produtos cárneos, leite e derivados, cereais, condimentos, molhos preparados, produtos de confeitaria/panificação e macarrões industrializados<sup>1,10,12,19,24,27</sup>; entretanto, não há relatos de surtos na literatura envolvendo esta bactéria.

Segundo BRYAN<sup>4</sup>, nos Estados Unidos, 1,9% dos surtos de enfermidade bacteriana ocorridos entre 1973 e 1976 em estabelecimentos de serviço de alimentação foram provocados por *Bacillus cereus*. Nos surtos relatados no Brasil envolvendo tais estabelecimentos, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* são os agentes etiológicos mais freqüentemente implicados. PENNA et alii<sup>22</sup>, analisando alimentos de 382 restaurantes industriais, verificaram a ocorrência de contagens para *Bacillus cereus* de até 10<sup>6</sup> UFC/g em 9% das amostras. No estudo realizado por SALZBERG et alii<sup>26</sup>, esta bactéria foi considerada suspeita, juntamente com *Clostridium perfringens*, pela enfermidade alimentar ocorrida em dois restaurantes de uma mesma instituição de Campinas.

Os principais fatores que contribuem para a ocorrência de enfermidade alimentar por *Bacillus cereus* são: utilização de alimentos crus ou ingredientes contaminados por esporos, cozimento e resfriamento inadequado do alimento, equipamento contaminado, intervalo de tempo igual ou superior a 12 horas entre o preparo e o consumo, manutenção do alimento quente a temperaturas impróprias e reaquecimento inadequado<sup>3,6,9,25</sup>.

No período de 1987 a 1993, *Staphylococcus aureus* foi responsável por 31,6% do total de surtos elucidados em Campinas, tendo sido incriminado em 21,4% dos surtos causados por alimentos preparados em serviços de alimentação. A Tabela 2 mostra os alimentos envolvidos nestes incidentes.

*Staphylococcus aureus* foi um dos agentes etiológicos mais freqüentemente envolvido em surtos de enfermidade alimentar ocorridos na Inglaterra/País de Gales, Austrália e Estados Unidos, em diferentes períodos estudados<sup>3,9,25</sup>.

A principal fonte de contaminação de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica é, invariavelmente, manipuladores portadores de cepas enterotoxigênicas. As práticas de higiene inadequadas ou inexistentes no preparo de alimentos e a manutenção dos mesmos por longo período de tempo a temperaturas impróprias possibilitam uma intensa proliferação do microrganismo com liberação de toxinas, até alcançar níveis capazes de provocar intoxicação<sup>4,6,7,11,15,21,22</sup>.

## CONCLUSÕES

Baseado nos dados epidemiológicos disponíveis, que comprovam a alta incidência de surtos de enfermidade alimentar em serviços de alimentação, é desejável que tais estabelecimentos priorizem o controle higiênico-sanitário dos alimentos, de forma a resguardar a saúde dos consumidores. A aplicação do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em serviços de alimentação pode atender plenamente a este propósito.

Os procedimentos rotineiros de manipulação e preparo dos alimentos, bem como a sua conservação, merecem atenção especial por parte de órgãos de Saúde Pública, como tema de campanhas educativas destinadas aos proprietários de serviço de alimentação, manipuladores e à comunidade.

## AGRADECIMENTOS

À Vigilância Sanitária Municipal de Campinas- SP. - e, em particular, ao Dr. Idalvo Salioni, que permitiram o acesso aos laudos de análise dos alimentos e inquéritos epidemiológicos.

Ao Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Campinas, responsável pela realização das análises microbiológicas dos alimentos.

RIALA6/799

PASSOS M.H.C.R.e KUAYNE, A. Y. - EVALUATION OF FOODBORNE DISEASE OUTBREAKS PROVED BY LABORATORY TEST IN THE CITY OF CAMPINAS-SP - BETWEEN 1987 AND 1993. Predominance of outbreaks in food service establishments and etiologic agents involved. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):77-82, 1996.

ABSTRACT: Between 1987 and 1993, the local Health Protection Department investigated 53 foodborne disease outbreaks in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Nineteen outbreaks were confirmed through laboratory testing. Foods prepared in foodservice establishments accounted for 14(73,6%) of the outbreaks, while foods mishandled in homes and in bakeries/confectioneries accounted for 3(15,8%) and 2(10,5%), respectively. The results indicated that *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were accountable, respectively, for 68,4 and 31,6% of the total outbreaks. *Bacillus cereus* accounted for 78,6% and *S. aureus* for 21,4% of the outbreaks associated with foodservice establishments. This paper discusses the importance of these microorganisms as etiologic agents of foodborne disease outbreaks and the main factors which contributed to the occurrence of these incidents.

DESCRIPTORS: Foodborne disease outbreaks, foodservice establishments, etiologic agents.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, R.C.C.&SCHNEIDER, I.S. - Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos ao varejo no município de Campinas. *Hig. Alim.*, 2(1/2):37-41,1983.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. - Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2<sup>nd</sup> ed., Washington, D.C., M.L. Speck, ed., 914p., 1984.
3. BEAN, N.H. & GRIFFIN, P.M. - Foodborne disease outbreaks in the United States 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Prot.*, 53(9):804-817, 1990.
4. BRYAN, F.L. - Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *J. Food Prot.* 41(10): 816-827, 1978.
5. BRYAN, F.L. - Hazard analysis critical control point approach: epidemiologic rationale and application to foodservice operations. *J. Environ. Health* 44(1): 7-14,1981.
6. BRYAN, F.L. - Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J. Food Prot.*, 51(8): 663-673, 1988.
7. CERQUEIRA, A.M.F.; MOREIRAS, M.I.F.; SILVA, M.H.O.; NOLETO, A.L.S. - Surto de intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 13<sup>o</sup>, São Paulo, 1992. *Resumos*. São Paulo, p.265, 1992.
8. CHIPLEY, J. R. & CREMER, M.L. - Microbiological problems in the food service industry. *Food Technol.*, 34(10):59-68, 84, 1980.
9. DAVEY, G.R. - Food poisoning in New South Wales: 1977-84. *Food Technol. Australia*, 37(10):453-456, 1985.
10. DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; UBOLDI EIROA, M.M. - *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. *Bol. ITAL.*, 60:31-40, 1978.
11. EIROA, M.N.U. - Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causados por alimentos processados. *Col. ITAL*, 19(2):101-112, 1989.
12. FURLANETTO, S.M.P. - Dados sobre a presença em alimentos ou multiplicação em alimentos, de bactérias responsáveis por toxinfecções de origem alimentar no Brasil. In: SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Campinas, p. 167-170, 1989.
13. GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. - *Bacillus cereus*: food poisoning organisms. A review. *J. Milk Food Technol.*, 35(4):213-217, 1972.
14. HOBBS, B.C. - *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* infections. In: REIMANN, H.,

- ed. Foodborne infections and intoxications. *Academic Press*, New York, USA, p. 131-173, 1969
15. IARIA, S.T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. - Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. *Rev. Saúde Públ.*, **14**(1):93-100, 1980.
16. KOTAKA, P.I.; CAMARGO, N.J.; PAZELLO, J.F.; VIEIRA, H.R.A. - Surto de toxinfecção alimentar, ocorrido em Curitiba-PR /1978. *Bol. Epidemiol. FSESP*, **11**(6), 1979.
17. LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P. - Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella bredeney*. *Rev. Saúde Públ.*, **19**(1):92-93, 1985.
18. LUND, B.M. - Foodborne illness. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet*, **336** (8721): 982-986, 1990.
19. MC KNIGHT, I.C.S & LEITÃO, R.F.F.; LEITÃO, R.F.F. - *Bacillus cereus* em macarrões industrializados. II. Ocorrência em produtos comerciais e sua multiplicação no alimento preparado para consumo. *Rev. Microbiol.*, **21**(3)268-275, 1990.
20. MOTA, C.C.S.; VIEIRA, H.R.A.; PUZYNA, I.P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J.F.; CAMARGO, N.J. - Toxi-infecção alimentar por *Salmonella enteritidis*. Relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. *Hig. Alim.*, **2**(3):123-131, 1983.
21. PENNA, T.C.V.; ABE, L.E.; MACHOSHVILI, I.A.; COLOMBO, A.J.; BARUFFALDI, R. - Controle de qualidade no processamento de alimentos em restaurante industrial. *Bol. Centro Pesq. Proces. Alimentos*, **7**(1):62-69, 1989.
22. PENNA, T.C.V.; COLOMBO, A.J.; MELLO, Z.A.; MESQUITA, A.L. - Levantamento de microrganismos potencialmente patogênicos em alimentos servidos em restaurantes industriais. In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 12º., Rio de Janeiro, 1989. *Resumos*. Rio de Janeiro, p.131, 1989.
23. PICCOLO, R.C.; PIMENTEL, E.P.; FÁVERO, L.M.; RIZZO, M.A.; PASCHER, D.M. - Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar no município de São Paulo, em 1991. *Hig. Alim.*, **6**(23):28-30, 1992.
24. RABINOVITCH, I.; VICENTE, M.M.A.; GUAICURUS, T.V.; FREITAS, J.P.G.V.; MESQUITA, R.P. - Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **80**(1):1-9, 1985.
25. ROBERTS, D. - Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970-1979. *J. Hyg.*, **89**(3):491-498, 1982.
26. SALZBERG, S.P.; MASSAGUER, P.R.; SERRANO, A.M. - Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. *Rev. Microbiol.*, **13**(1):26-30, 1982.
27. SANTOS, J.G.; VASCONCELOS, J.C.; AQUINO, J.S.; SILVA, M.S.B. - Determinação quantitativa de *Bacillus cereus* em carne moída comercializada em Manaus-AM. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*, 13º. São Paulo, 1992. *Resumos*. São Paulo, p.277, 1992.
28. SNYDER, O.P.Jr. HACCP - An industry food safety self-control program-Part IV. *Dairy, Food Environ. Sanit.*, **12**(4):230-232, 1992.

Recebido para publicação em 14/06/95

## COMPARAÇÃO ENTRE OS CALDOS DE ENRIQUECIMENTO "TRYPTIC SOY" COM 10% DE CLORETO DE SÓDIO E GIOLITTI - CANTONI USADOS NA DETERMINAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA EM ALIMENTOS

Jacqueline Tanury Macruz Peresi\*  
Mituca Kaku\*  
Dilma Scala Gelli\*\*  
Sonia Isaura de Lima\*  
Vera Lúcia Silveira Duarte\*

RIALA6/800

PERESI, J.T.M. e col. - Comparação entre os caldos de enriquecimento Tryptic Soy com 10% de cloreto de sódio e Giolitti - Cantoni usados na determinação de estafilococos coagulase positiva em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):83-86, 1996.

RESUMO: Foi comparada a eficiência entre dois meios de cultura: Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio (TSBS) e Giolitti - Cantoni Broth (GC) na detecção de *Staphylococcus aureus* em alimentos não processados e processados termicamente; portanto, passíveis de conter células injuriadas pelo calor e/ou pequena quantidade de microrganismos. A técnica utilizada foi a do Número Mais Provável, favorecendo a recuperação do *Staphylococcus aureus*.

O meio GC, além de suas substâncias enriquecedoras, apresenta um sistema inibitório mais acentuado que o TSBS, sendo constituído por cloreto de lítio, telurito de potássio combinado com glicina e condição anaeróbica dada pela adição de vaselina líquida sobre o meio já inoculado. Com essas propriedades o mesmo apresentou maior capacidade de recuperação de *S. aureus*, como também obteve menor número de falsos positivos, quando comparado com o TSBS.

DESCRIPTORIOS: Estafilococos coagulase positiva; Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio; Giolitti-Cantoni Broth; Meios de enriquecimento.

### INTRODUÇÃO

Estafilococos coagulase positiva, devido à sua ampla distribuição, tem sido responsável por alta incidência de enfermidades transmitidas por alimentos<sup>3</sup>. Ainda é parâmetro microbiológico constante na legislação em vigor.

O referido microrganismo pode estar presente em grande número em alimentos, sendo isolado em meios de cultura convencionais contendo agentes seletivos, inibindo, assim, grande parte da microbiota existente no alimento<sup>8</sup>. Embora os meios seletivos sejam aceitos para enumeração de células não debilitadas,

eles freqüentemente inibem o crescimento de células injuriadas<sup>4,8</sup>. A detecção dessas células, no entanto, é importante, pois quando em condições favoráveis de crescimento produzem enterotoxina e, portanto, podem ser causa potencial de doenças de origem alimentar<sup>9</sup>. A enumeração e isolamento desses microrganismos dependem de meios de recuperação<sup>5</sup>.

A metodologia recomendada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC)<sup>2</sup> preconiza a utilização do meio de cultura Tryptic Soy Broth acrescido de 10% de cloreto de sódio (TSBS) para a detecção de *S. aureus*. Trata-se de um meio de enriquecimento recomendado principalmente para análise de alimentos onde se espera encontrar células injuriadas ou baixa concentração destes microrganismos<sup>4</sup>. O cloreto de sódio

\* Do Instituto Adolfo Lutz - Lab.I de São José do Rio Preto-SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz - Lab. Central - São Paulo - SP.

na citada concentração exerce a função de inibir a microbiota presente, facilitando o desenvolvimento do *S. aureus*<sup>5</sup>. Porém tem sido demonstrado que esse meio inibe células injuriadas e não injuriadas de *S. aureus*<sup>4</sup>.

O meio de cultura Giolitti - Cantoni Broth (GC) é proposto e foi comparado com TSBS. Além de substâncias enriquecedoras para *S. aureus* como a manita, piruvato de sódio e glicina, o meio possui cloreto de lítio que inibe bacilos gram negativos fermentadores da lactose e telurito de potássio combinado com glicina, inibindo bacilos gram positivos. A vaselina líquida adicionada nos tubos após a sementeira cria condições para a inibição de micrococos<sup>3</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### A - Meios de cultura:

1) Tryptic Soy Broth (Difco 0370-17) preparado de acordo com as especificações do fabricante ao qual foi adicionado cloreto de sódio na concentração de 10%, antes da autoclavação do meio. Distribui-se o meio em tubos de 16 x 160mm e 18 x 180 mm em concentração simples e dupla respectivamente, num volume de 8 e 13ml.

2) Giolitti Cantoni Broth Base (Difco 1809-17-2), preparado de acordo com as especificações do fabricante, ao qual foi adicionado 15,8 ml/l de telurito de potássio na concentração de 3,5% após a autoclavação do meio e no momento do uso. O referido meio de cultura foi distribuído em concentração simples em tubos de ensaio de 16 x 160mm e 18 x 180 mm num volume de 9 e 18 ml respectivamente.

### B - Amostras

Foram analisadas 213 amostras de alimentos, sendo 167 de leite pasteurizado, 10 de condimentos e temperos, 14 de produtos de confeitaria, 7 de pratos prontos para o consumo, 4 de carnes e derivados, 4 de gelados comestíveis, 2 de derivados de leite e 5 de amostras diversas, coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias dos ERSAS de abrangência do Lab. I de São José do Rio Preto, Delegacias de Polícias e pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

### Alimentos sólidos:

Após homogeneização de 25g em 225 ml de água peptonada 0,1%, alíquotas de 10, 1,0 e 0,1 ml foram transferidas respectivamente para a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> séries de tubos de TSBS, correspondendo assim a 1,0g; 0,1g e 0,01g do alimento sob análise. A técnica foi a de tubos múltiplos, série de 3, Número Mais Provável - NMP<sup>7</sup>.

Amostras líquidas foram semeadas diretamente: alíquotas de 1 ml foram transferidas para a 1<sup>a</sup> série

de 3 tubos; a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> séries receberam, respectivamente, 1,0 ml das diluições 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> correspondendo, assim, a 0,1 ml e 0,01 ml do alimento analisado.

Foram considerados suspeitos para estafilococos coagulase positiva, os tubos de TSBS que apresentaram turvação após 24-48h de incubação a 35°C. Material dos mesmos foi plaqueado em agar chocolate para o isolamento deste microrganismo, caso presente. Colônias suspeitas foram semeadas em agar Baird-Parker para verificação de comportamento da bactéria no referido meio de cultura. Após esta avaliação, a colônia foi repicada em agar nutriente para posterior prova de coagulase em lâmina e em tubo. Considerou-se tubo positivo aquele que apresentou cepas coagulase positiva em lâmina e em tubo (4+). O resultado foi expresso em NMP.

Os materiais semeados em caldo GC foram tratados conforme descrito para o TSBS, observando, porém, que os tubos considerados suspeitos foram os que apresentaram enegrecimento do meio após 24-48h de incubação a 35°C, sendo posteriormente semeados em agar Baird-Parker.

## RESULTADOS

Os resultados de amostras suspeitas, ou seja, com turvação no caldo TSBS e enegrecimento em GC e confirmadas, com isolamento a partir do agar Baird-Parker de colônias coagulase positivas, estão expressos na Tabela 1.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os dados expressos na Tabela 1 indicam que a presença de estafilococos coagulase positiva é significativa em produtos de confeitaria, leite fluído e pratos prontos para o consumo, independente do meio de enriquecimento utilizado. Entretanto, os dados indicam que a positividade é proporcionalmente maior no GC. Os resultados obtidos pelo GC indicaram a presença desta bactéria em gelados comestíveis (sorvetes), enquanto que no TSBS não houve positividade. Esta observação permite concluir que o sistema inibitório presente no GC não interfere na recuperação de células injuriadas fisiologicamente.

A análise da Tabela 1 também revela que o número de tubos suspeitos em TSBS apresentam uma positividade para estafilococos coagulase positiva proporcionalmente menor que a encontrada com o caldo GC.

Pela Tabela 2, observa-se diferenças quanto ao NMP. Os níveis encontrados pelo uso do GC são maiores do que os respectivos, encontrados no TSBS.

TABELA 1

Amostras suspeitas e confirmadas para estafilococos coagulase positiva em TSBS<sup>1</sup> e GC<sup>2</sup>.

AMOSTRAS	Nº DE AMOSTRAS	TSBS <sup>1</sup>				GC <sup>2</sup>			
		COM TURVAÇÃO <sup>3</sup>		CONFIRMAÇÃO <sup>4</sup>		ENEGRECIMENTO <sup>3</sup>		CONFIRMAÇÃO <sup>4</sup>	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leite	167	165	98,8	7	4,2	84	50,3	23	13,8
Condimentos e temperos	10	5	50,0	0	0	1	10,0	0	0
Produtos de confeitaria	14	14	100,0	8	57,1	12	85,7	10	71,4
Pratos prontos para o consumo	7	6	85,7	1	14,3	6	85,7	2	28,6
Carnes e derivados	4	2	50,0	0	0	1	25,0	0	0
Gelados comestíveis	4	4	100,0	0	0	3	75,0	1	25,0
Derivados do leite	2	2	100,0	0	0	2	100,0	0	0
Outros	5	3	60,0	0	0	0	0	0	0
Total	213	201	94,3	16	7,5	109	51,2	36	16,9

<sup>1</sup> - Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio

<sup>2</sup> - Giolitti-Cantoni Broth

<sup>3</sup> - Leitura direta após incubação do Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio e tubos de Giolitti-Cantoni com enegrecimento (suspeitos)

<sup>4</sup> - Colônias coagulase positivas isoladas do agar Baird-Parker

Os níveis de estafilococos coagulase positiva, obtidos por NMP, estão expressos na Tabela 2.\*

TABELA 2\*

NMP mínimo e máximo de estafilococos coagulase positiva em TSBS<sup>1</sup> e GC<sup>2</sup>

AMOSTRAS	TSBS <sup>1</sup>		GC <sup>2</sup>	
	MÍNIMO	MÁXIMO	MÍNIMO	MÁXIMO
Leite	0,3	2,1	0,3	9,3
Condimentos e temperos	0	0	0	0
Produtos de confeitaria	1,2	110	0,91	>240
Pratos prontos para o consumo	3,6	3,6	0,91	24,0
Carnes e derivados	0	0	0	0
Gelados comestíveis	0	0	0	0,36
Derivados de leite	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0

<sup>1</sup> - Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio

<sup>2</sup> - Giolitti - Cantoni Broth

Durante a realização deste trabalho, observou-se que o número de suspeitos é maior quando do uso do TSBS (Tabela 1) e que o NMP confirmado é relativamente diferente, mais baixo, quando comparado com o caldo GC, cujo NMP dos suspeitos é mais próximo dos confirmados, indicando maior especificidade do meio.

Pelo exposto, conclui-se que o uso do caldo GC permite melhor recuperação e quantificação de estafilococos coagulase positiva em alimentos. Este meio, por estas características, pode ser considerado mais adequado, apresentando ainda menor incidência de tubos falsos positivos, quando comparado com o TSBS.

Novas metodologias como da APHA<sup>6</sup> indica o uso do meio Tryptic Soy Broth adicionado de 10% de cloreto de sódio e de 1% de piruvato de sódio. Portanto, considerando o presente levantamento, sugere-se a complementação dos dados deste trabalho comparando o meio GC com o meio citado acima (APHA).

Sugere-se ainda que a avaliação dos métodos de recuperação seja considerada, quando do estabelecimento de normas e padrões de qualidade de produtos alimentícios.

RIALA6/800

PERESI, J.T.M. e col. - Comparison of Tryptic Soy Broth with 10% salt and Giolitti-Cantoni Broth used in determination of coagulase positive staphylococci in foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):83-86, 1996.

ABSTRACT: The efficiency among two media was compared: Tryptic Soy Broth with 10% salt (TSBS) and Giolitti Cantoni Broth (GC) to detect and enumerate *Staphylococcus aureus* in non processed and thermally processed food supposed to contain injured cells by high temperature treatment and/or to contain small numbers of this microorganisms. The technique used was the Most Probable Number (MPN), supporting the recovering of *Staphylococcus aureus*.

The GC broth medium, with its enrichment substances and lithium chloride, potassium tellurite with glycine used under anaerobic condition due to the addition of liquid vaseline immediately before inoculation shows stronger inhibitory effect to the non *S. aureus* microorganisms, when compared with TSBS. Despite this, the medium showed a better capacity on recovering *S. aureus*, showed also a smaller number of false positives when compared to the TSBS.

KEY-WORDS: Coagulase-positive staphylococci; Tryptic Soy Broth with 10% salt; Giolitti-Cantoni Broth; enrichment medium.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAER, E.F.; GRAY, R.J.H.; ORTH, D.S. - "Methods for the Isolation and Enumeration of *Staphylococcus Aureus*". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Speck, M.L., ed. 1<sup>st</sup> ed., C. 31, p. 374-386, 1976.
2. Bennett, R.W. - revisão 1980. - "*Staphylococcus aureus*". In: *Bacteriological Analytical Manual* - AOAC, ed. 5 th ed. revisada, c.XI, p. XI-6 e XI-7, 1978.
3. GIOLITTI, G. & C. CANTONI, - A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. *J. Appl. Bacteriol.*, **29**:395-398, 1966.
4. GRAY, R.J.H.; M.A. GASKE, & Z.J., ORDAL. - Enumeration of thermally stressed *Staphylococcus aureus* MF 31. *J. Food Sci.*, **39**: 844-846, 1974.
5. LANCETTE, G.A. - Current Resuscitation Methods for Recovery of Stressed *Staphylococcus aureus* Cells from Foods. *J. Food Prot.*, **49**:477-481, 1986.
6. LANCETTI, G.A.; TATINI, S.R., - "*Staphylococcus aureus*". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Vanderzant, C. e Splittstoesser, D.F., ed. 3 rd, c.33, p. 541-542.
7. PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A.; RAINOSEK, A.P. - "The Most Probable Number Technique". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Vanderzant, C. e Splittstoesser, D.F., ed. 3 rd, c. 6, p. 105-120, 1992.
8. RAY, B. - Methods to detect stressed microorganisms. *J. Food Prot.* **42**:346-355, 1976.
9. SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L. & PALUMBO, S.A. - Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J. Food Prot.*, **46**:545-555, 1983.

## ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub>

Célia Maria de SYLOS\*  
Delia Rodriguez AMAYA\*\*

RIALA6/801

SYLOS, C. M. de e col. - Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):87-97, 1996.

**RESUMO:** Várias tentativas foram realizadas para escolher o solvente extratante mais eficiente e a melhor técnica para remover os interferentes de amostras de leite para a determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em camada delgada. Na extração foram utilizados acetona, metanol e clorofórmio individualmente, misturados entre si ou com água. Precipitação com sais de metais pesados, partição entre solventes imiscíveis e colunas cromatográficas foram avaliados para promover a limpeza do extrato. A utilização de metais pesados não foi eficiente para eliminar os interferentes. O uso conjunto de clorofórmio e uma coluna cromatográfica demonstrou ser a maneira mais eficiente de extrair a aflatoxina M<sub>1</sub> e remover substâncias interferentes. Colunas cromatográficas de sílica e sílica-C<sub>18</sub> apresentaram melhores resultados que a coluna de celulose. A cromatografia líquida de alta eficiência com extração em fase sólida, limpeza em coluna de sílica gel e derivação da aflatoxina M<sub>1</sub> por ácido trifluoroacético e detecção por fluorescência apresentou sensibilidade e especificidade bem maiores que o método por cromatografia em camada delgada com quantificação visual baseada na intensidade de fluorescência.

**DESCRIPTORIOS:** Aflatoxina M<sub>1</sub>, leite. Cromatografia em camada delgada, Cromatografia líquida de alta eficiência, Análise.

### INTRODUÇÃO

As investigações sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações é de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, no controle ou na destoxificação dos produtos susceptíveis a determinadas micotoxinas. Neste sentido e com vistas a garantir a confiabilidade dos resultados relativos à incidência de micotoxinas em alimentos, estudos visando escolher e aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são, sem dúvida, necessários e urgentes.

Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxidez e ampla ocorrência,

possuindo, inclusive, propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. As aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> são as mais estudadas, já existindo metodologia definida para uma série de produtos agrícolas. Numerosos levantamentos sobre sua ocorrência em alimentos e rações também já foram realizados<sup>11,19</sup>.

Quando o gado leiteiro é alimentado com ração contaminada com aflatoxina B<sub>1</sub>, parte desta pode ser convertida em um derivado 4-monoidroxilado, a aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), a qual é excretada no leite<sup>8,15</sup>.

Allcroft & Carnaghan<sup>1</sup>, Purchase<sup>16</sup> e Bullerman<sup>1</sup> verificaram que a toxidez da AFM<sub>1</sub> em patinhos e ratos aproximava-se da de aflatoxina B<sub>1</sub>. O seu efeito carcinogênico ainda é controverso. Sinnhuber et alii<sup>24</sup> observaram o crescimento de tumores similares

\* Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - CP 502 - 14801-902 - Araraquara - SP.

\*\* Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - CP 6121 - 13081-870 - Campinas - SP.

àqueles produzidos pela aflatoxina B<sub>1</sub> em trutas alimentadas com aflatoxina M<sub>1</sub>. Por outro lado, Barnes<sup>3</sup> não observou a formação de tumores no fígado de ratos que foram alimentados com AFM<sub>1</sub>. Em experimentos com ratos machos, a AFM<sub>1</sub> mostrou menor potencial carcinogênico que AFB<sub>1</sub>.<sup>9</sup>

Estudos realizados para determinar a relação entre a ingestão de aflatoxinas e a excreção de AFM<sub>1</sub> no leite demonstraram uma conversão média de 1,5%<sup>8,12, 13,14,15</sup>.

O conhecimento da incidência e dos níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e seus derivados, produtos consumidos pela população infantil, é imprescindível, uma vez que estudos de toxicidade com animais têm mostrado que a sensibilidade às aflatoxinas é maior em jovens. No Brasil, existe ainda uma lacuna de informações sobre esta toxina, tanto em relação à metodologia quanto à sua incidência.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as metodologias, por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para aflatoxina M<sub>1</sub> em leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Preparo de Amostras Artificialmente Contaminadas*

Para a avaliação dos métodos de determinação de AFM<sub>1</sub>, foram utilizadas amostras de leite pasteurizado, artificialmente contaminado com 200 a 400 ng/L de AFM<sub>1</sub> e amostras de leite em pó, acrescidas com 300 a 500 ng/L de AFM<sub>1</sub>. Estas amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

- a) leite em pó: as quantidades necessárias de padrão, dissolvidas na mistura benzenoacetonitrila (9:1), foram gotejadas sobre 5g da amostra de forma a evitar que a solução atingisse as paredes e deixando-se que o solvente se evaporasse de um dia para o outro.
- b) leite pasteurizado: nesse caso, a quantidade necessária de padrão, dissolvido em acetonitrila, foi adicionada a 50 ml de amostra, seguida de homogeneização por agitação.

A pureza do padrão de AFM<sub>1</sub> (Sigma, EUA), foi verificada através de CCD (Cromatografia em camada delgada) e espectrometria de absorção<sup>6</sup>.

### *Avaliação da Etapa de Extração*

Foram avaliados vários métodos existentes na literatura, assim como tentativas de novos procedimentos. Na Tabela I estão relacionadas todas as tentativas que foram feitas com relação à escolha do solvente

extrator e sobre a melhor maneira de se remover os interferentes. Cada teste foi realizado em triplicata.

No caso do leite pasteurizado usou-se 50 ml de amostra e para leite em pó, 5g de amostra diluída em 50 ml de água destilada.

O procedimento para extração com metanol puro foi o proposto por Sabino et alii<sup>18</sup>. Na tentativa de eliminar-se o problema de emulsão, também foi utilizado metanol-KCl 4%<sup>25</sup>, seguindo o mesmo procedimento para metanol puro. A extração com a mistura metanol-acetona (5:2) foi realizada de acordo com Dominguez et alii<sup>7</sup>.

O esquema 974.17 da AOAC<sup>21</sup> (Figura 1) descreve a extração de 100 ml de amostra de leite pasteurizado (ou 10g de leite em pó dissolvido em 100ml de água) com acetona pura. Tentativas de se usar 50 ml de amostra, em vez dos 100 ml originais foram feitas, assim como a extração com a mistura acetona-água<sup>17</sup> e acetona salina.

No caso do uso de clorofórmio puro como solvente extrator, os métodos utilizados foram o procedimento 980.1 da AOAC<sup>21</sup> (Figura 2) e o proposto por Serralheiro & Quinta<sup>23</sup>.

### *Avaliação da Etapa de Limpeza*

Com relação ao uso de agentes clarificantes para remoção de substâncias indesejáveis, foram testados os seguintes sais: (1) sulfato de cobre 10%<sup>25</sup>; (2) sulfato de amônia 30%<sup>25</sup>; (3) sulfato de zinco 15%<sup>26</sup>; (4) acetato de zinco 20% (5) acetato de chumbo 20% (AOAC, esquema 974.17)<sup>21</sup>; (6) cloreto férrico (2g/30ml de água + 170 ml de 0,2N NaOH)/1g de carbonato de cobre básico<sup>17</sup>; (7) acetato de zinco 15%/ cloreto de sódio 15% (1:1)<sup>10</sup>.

Para remoção dos lipídeos, foi efetuado desengorduramento com hexano ou éter de petróleo antes da etapa de partição com clorofórmio.

Foram avaliadas também as colunas cromatográficas de celulose (MERCK, Alemanha) (AOAC, proc. 974.17)<sup>21</sup> (Figura 1) e de sílica gel (MERCK, Alemanha) (AOAC, proc. 980.21)<sup>20</sup> (Figura 2) para limpeza.

Considerando que alguns pesquisadores empregaram com sucesso o cartucho descartável de Sep-Pack C<sub>18</sub> para extração de AFM<sub>1</sub> e limpeza de amostras de leite a serem utilizadas em CLAE, foi realizada uma tentativa de proceder à limpeza da amostra em coluna empacotada de C<sub>18</sub>. Nesse caso a AFM<sub>1</sub>, após extração com clorofórmio, foi transferida para acetona e o extrato colocado numa coluna de vidro (8x300 mm) contendo sílica C<sub>18</sub> (0,5g) (50µm, SEPARATION TECHNOLOGY, EUA) como fase estacionária, e a AFM<sub>1</sub> eluída com acetona.

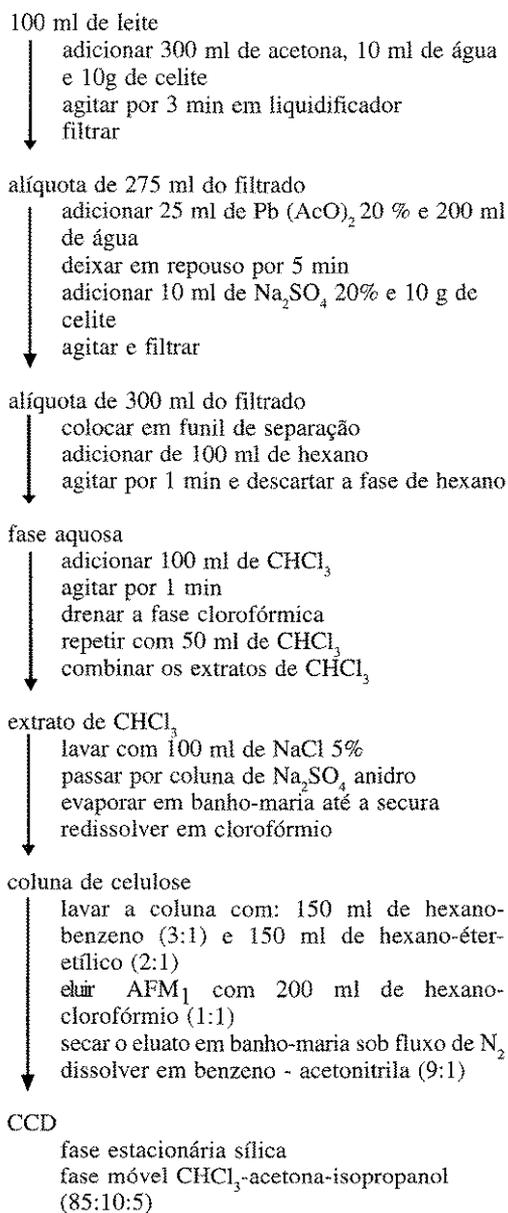


FIGURA 1

Esquema para determinação de AFM<sub>1</sub> pelo procedimento 974.17 da AOAC<sup>21</sup>.

Foi realizada também uma tentativa de se reaproveitar a coluna de C<sub>18</sub>, material importado e caro. Nesse sentido após a eluição da toxina, a coluna foi lavada com clorofórmio e a seguir com hexano para remover as substâncias interferentes na mesma, retidas, sendo o C<sub>18</sub> recondicionado com acetona, antes de se aplicar uma nova amostra.

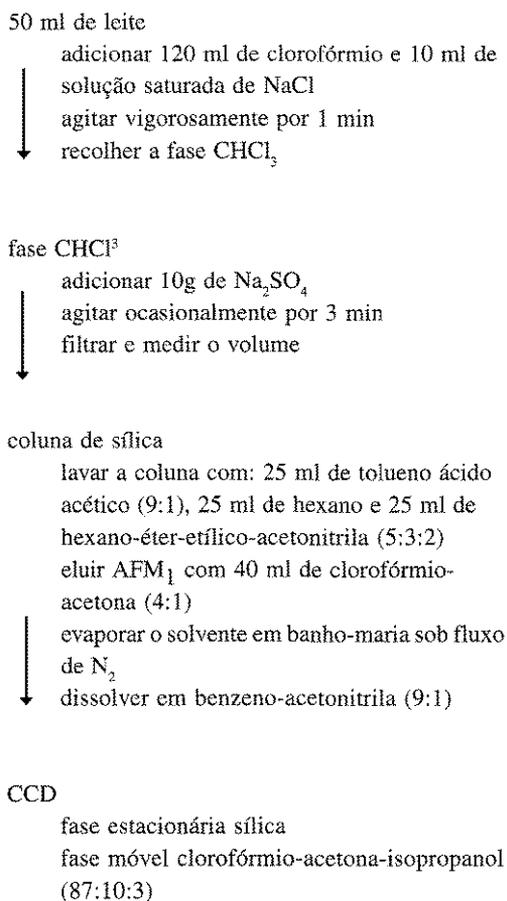


FIGURA 2

Esquema para determinação de AFM<sub>1</sub>, de acordo com o procedimento 980.21 da AOAC<sup>21</sup>.

### Separação e Quantificação

#### Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) de cromatofolhas de sílica gel G60 (MERK, Alemanha) foi inicialmente realizada, testando-se as seguintes

fases móveis: (1) clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3)<sup>21</sup>, (2) clorofórmio-acetona (9:1)<sup>17</sup>; (3) clorofórmio-acetona-metanol (90:10:2)<sup>21</sup>, (4) éter etílico-metanol-água (95:4:1)<sup>23</sup>; (5) tolueno-acetato de etil-ácido fórmico (6:3:1)<sup>23</sup>.

O extrato seco da amostra foi dissolvido em 100µl de benzeno-acetonitrila (9:1), sendo uma alíquota aplicada na camada juntamente com volumes conhecidos de padrão de AFM<sub>1</sub> (0,5µg/ml). Após o desenvolvimento cromatográfico, a quantificação foi feita por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha da amostra com as dos padrões, sob iluminação ultravioleta longa (365nm).

Também foi realizado CCD bi-dimensional, usando-se inicialmente o solvente éter etílico-metanol-água (95:4:1) e posteriormente clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3).

A confirmação da AFM<sub>1</sub> foi feita por reação com ácido trifluoroacético (TFA) diretamente na camada, de acordo com a AOAC<sup>21</sup>.

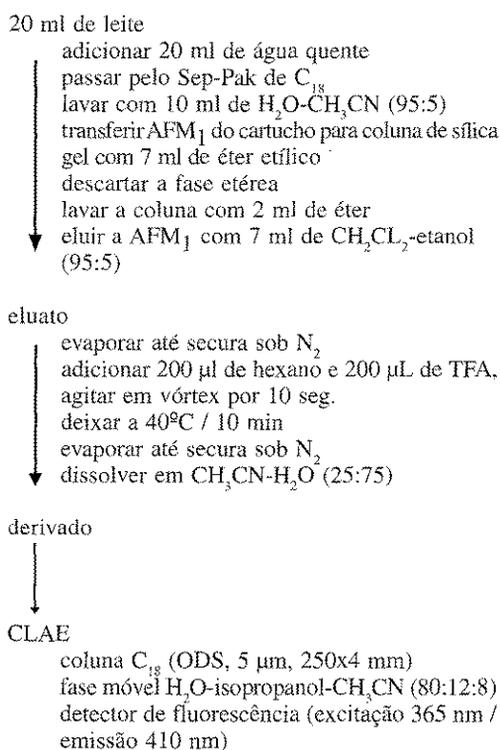


FIGURA 3

Esquema para extração de AFM<sub>1</sub> com Sep-pak de C<sub>18</sub>, proc. 986.16 da AOAC<sup>21</sup>.

### Cromatografia líquida de alta eficiência

A AFM<sub>1</sub> foi extraída da amostra de leite em cartucho Sep-Pak de C<sub>18</sub> (WATERS), transferida com éter para uma coluna de sílica, eluída com diclorometano-etanol (95:5) e finalmente derivada com ácido trifluoroacético, de acordo com o método da AOAC<sup>21</sup> (proc. 986.16) (Figura 3).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando-se os equipamentos e condições descritos a seguir: Cromatógrafo líquido marca VARIAN, modelo 8500, com sistema de bombeamento de solvente adaptado com alça de amostra de 10µl; detector por fluorescência VARIAN, modelo 2070, excitação a 365nm e com emissão a 410nm; e integrador VARIAN modelo 4290; coluna LiChrospher 100 RP-18, 5µm (100x4,6mm, Merck), precedida de coluna de guarda; fase móvel; água-isopropanol-acetonitrila (80:12:8) e vazão de 0,5 ml/min.

A quantificação foi feita por padronização externa. Foi construída uma curva padrão com soluções contendo 4, 8, 16 e 32 ng de AFM<sub>1</sub> por ml de acetonitrila, que reagiram também com TFA e injetadas nas mesmas condições das amostras. A curva padrão apresentou linearidade e passou pela origem, englobando as concentrações de AFM<sub>1</sub> encontradas nas amostras.

Os solventes empregados, marca LiCHROSOLV, foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, empregando-se membrana de 0,45 µm e a seguir degaseificado por ultrassom. A água utilizada foi purificada por sistema de ultrafiltração Milli Q Plus (WATERS) e também degaseificada. As amostras e os padrões foram também filtrados em membrana (Millipore) de 0,45µm.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os limites estipulados para aflatoxina M<sub>1</sub> em alimentos são da ordem de ng/l ou ng/kg (ppt), níveis extremamente baixos que exigem dos métodos o máximo de sensibilidade e especificidade. Embora a amostragem não seja problema devido à distribuição uniforme dessa toxina nos alimentos, as etapas de extração e de remoção dos interferentes requerem muito cuidado. Tais problemas não são tão críticos nas metodologias de aflatoxinas B e G cujos limites permitidos estão na faixa de µg/kg (ppb), sendo nesses casos a amostragem o principal desafio.

#### Extração e Limpeza

As características dos extratos finais de aflatoxina M<sub>1</sub>, obtidos nas várias tentativas com vistas a escolha do solvente extrator e da maneira de remover os interferentes, estão apresentados na Tabela 1.

Os procedimentos que utilizam metanol para extração proporcionaram certa dificuldade na filtração, prolongando-a e às vezes demandando centrifugação. Além disso, os vários clarificantes testados não se mostraram totalmente eficientes, resultando em extratos ainda sujos que, quando aplicados em camada delgada, apresentavam manchas com caudas e interferentes, merecendo destaques uma substância amarela fluorescente e outra verde azulada com Rf's muito próximos, e que em muitos casos sobrepunham-se à toxina.

A tentativa de fazer a extração utilizando a mistura metanol-acetona (5:2), de acordo com o procedimento

de Dominguez et alii<sup>7</sup>, não foi bem sucedida, pois mesmo após a centrifugação, as fases voltavam a misturar-se com facilidade na hora de recolher a fase desejada.

Os procedimentos que utilizam acetona como solvente extrator e sais como agentes clarificantes não mostraram-se eficientes na remoção dos interferentes. O extrato final permaneceu sujo, a substância que apresentava fluorescência azul esverdeada e comportamento cromatográfico muito semelhante à AFM<sub>1</sub> não foi eliminada e as manchas apresentaram cauda (Tabela 1). O uso conjunto de acetato de chumbo, hexano e colunas cromatográficas de celulose e de

TABELA 1  
Características dos extratos finais de amostras de leite e de leite em pó obtidos das etapas de extração e limpeza para AFM<sub>1</sub> para CCD.

EXTRAÇÃO	LIMPEZA	APARÊNCIA DO EXTRATO FINAL	APARÊNCIA NA CD <sup>a</sup>	
			CAUDA	INTERFERENTES FLUORESCENTES <sup>b</sup>
metanol puro / ou metanol: NaCl 5% (9:1) (200 ml)	partição com hexano	sujo	sim	presente
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 10%	sujo	sim	presente
	FeCl <sub>3</sub> / CuCO <sub>3</sub>	sujo	sim	presente
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30%	sujo / oleoso	sim	presente
	Pb(AcO) 20%	sujo	sim	presente
	ZnSO <sub>4</sub> 15%	sujo / oleoso	sim	presente
acetona pura / ou acetona: água (85:15) ou acetona: NaCl 5% (9:1) (200ml)	ZnAcO 15% / NaCl 15%	sujo	sim	presente
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 10%	sujo / oleoso	sim	presente
	FeCl <sub>3</sub> / CuCO <sub>3</sub>	sujo	sim	presente
	Pb(AcO) 20%	sujo	sim	presente
	Pb(AcO) 20% hexano / coluna de celulose	limpo	não	presente / ausente
	Pb(AcO) 20% hexano / coluna de sílica gel	limpo	não	presente / ausente
acetona pura (300ml)	Zn(AcO) 15%	sujo / oleoso	sim	presente
	ZnSO <sub>4</sub> 15%	sujo / oleoso	sim	presente
	Pb(AcO) 20% / hexano / coluna de celulose	limpo	não	presente / ausente
	coluna de sílica gel	limpo	não	ausente
	coluna de C <sub>18</sub>	limpo	não	ausente
	partição com metanol / partição com CCl <sub>4</sub>	limpo	não	ausente / presente
clorofórmio(120ml)	partição com metanol / partição com éter de petróleo	sujo	sim	presente
	partição com metanol / partição com hexano	sujo	sim	presente
	partição com metanol / partição com éter butílico	sujo	sim	presente

<sup>a</sup>CD - Camada Delgada

<sup>b</sup>. Sob iluminação ultravioleta a 365 nm

sílica produziram extratos limpos, que não apresentaram, na maioria das vezes, caudas e interferentes fluorescentes na camada delgada.

A extração com clorofórmio com limpeza em coluna de sílica gel resultaram um extrato final não oleoso, livre de substâncias interferentes, apresentando manchas simétricas na camada delgada.

O método desenvolvido por Serralheiro & Quinta<sup>23</sup>, que consiste na extração com clorofórmio, transferência para metanol, e limpeza por partição com tetracloreto de carbono revelou-se eficiente. As tentativas de substituir-se o tetracloreto de carbono, solvente não recomendado pelo "Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer"<sup>22</sup> por éter butílico, éter de petróleo ou hexano não se revelaram satisfatórias.

Na coluna empacotada com C<sub>18</sub> (50µm) (fase reversa), a AFM<sub>1</sub> eluiu antes dos interferentes, ao contrário do que ocorre na coluna de sílica gel (fase normal). A limpeza foi eficiente, apresentando a mancha de AFM<sub>1</sub> na camada delgada, simétrica e separada dos interferentes.

O adsorvente C<sub>18</sub> foi reutilizado oito vezes com amostras de leite pasteurizado (Tabela 2), mas a coluna foi acumulando resíduos, tornando desse modo o fluxo cada vez mais lento e conseqüentemente dificultando o seu aproveitamento. Tal problema pode ser contornado diminuindo-se as dimensões da coluna, tornando-as mais próximas das do cartucho Sep-pak, porém, sua eficiência deverá ainda ser submetida à avaliação.

Para a coluna de sílica gel o eluente que apresentou melhor recuperação foi o que utilizou 60 ml de clorofórmio-acetona (3:2) (em lugar de 40ml de clorofórmio-acetona (4:1)). No caso da celulose, foi necessário substituir o clorofórmio-hexano (1:1) por clorofórmio-hexano-acetona (5:4:1).

A limpeza por cromatografia em coluna (geralmente sílica gel), apesar de ser utilizado em numerosos métodos para micotoxinas, é uma técnica trabalhosa e demorada, que requer grandes volumes de solventes para eluir separadamente os interferentes e as toxinas. Além disso, como a separação efetiva dos interferentes das toxinas depende diretamente da capacidade de adsorção da fase estacionária e do poder de eluição dos solventes utilizados, a reconhecida variação das propriedades dos adsorventes e da pureza dos solventes de diferentes marcas, ou até de diferentes lotes da mesma marca, torna necessária a realização de testes preliminares para cada remessa recebida, sob pena de obter-se resultados totalmente errôneos. No presente trabalho, por exemplo, para se garantir a eluição total de AFM<sub>1</sub> o volume de solvente clorofórmio-acetona (1:4) teve que ser aumentado de 40 para 60ml.

Utilizando-se os três tipos de adsorventes, foram testados a recuperação nas colunas, adicionando-se quantidades conhecidas de padrão às mesmas. A coluna de C<sub>18</sub> revelou-se melhor enquanto a de celulose foi a que mostrou menor recuperação (Tabela 3).

Na Tabela 4 estão expressos os valores de recuperação da AFM<sub>1</sub> adicionada ao leite pasteurizado e ao leite em pó, comparando-se três métodos que

TABELA 2

Recuperação de AFM<sub>1</sub> da coluna de C<sub>18</sub> reutilizada para amostras de leite pasteurizado.

REUTILIZAÇÃO	TEOR DE AFM <sub>1</sub> ADICIONADO (ng/l)	TEOR DE AFM <sub>1</sub> RECUPERADO (ng/l)	RECUPERAÇÃO (%)
1	500	415	83,0
2	400	350	87,7
3	200	179	89,8
4	200	153	76,6
5	250	226	90,4
6	250	219	87,6
7	200	155	77,6
8	300	245	81,7

TABELA 3

Recuperação de AFM<sub>1</sub> adicionada na coluna.

QUANTIDADE ADICIONADA (ng/l)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)			
	nº de repetições	Coluna de sílica gel <sup>a</sup>	Coluna de celulose <sup>b</sup>	Coluna de C <sub>18</sub> <sup>c</sup>
200	3	81,2	79,3	82,8
300	3	83,1	78,5	85,2
400	3	84,2	79,5	85,5

<sup>a</sup> - Eluída por acetona clorofórmio (3:2)

<sup>b</sup> - Eluída por hexano - clorofórmio (1:1)

<sup>c</sup> - Eluída por acetona pura

TABELA 4

Recuperação de AFM<sub>1</sub> em amostra de leite pasteurizado e em leite em pó no método completo

QUANTIDADE ADICIONADA (ng/l)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)			
	COLUNA DE SÍLICA GEL <sup>a</sup>	(Nº DE REPETIÇÕES ENTRE PARENTESSES)		
		COLUNA DE CELULOSE <sup>b</sup>	COLUNA DE C <sub>18</sub> <sup>c</sup>	CCl <sub>4</sub> <sup>d</sup>
leite pasteurizado				
200	77,4 (3)	74,4 (3)	82,9 (3)	77,6 (2)
250	78,2 (3)	61,1 (3)	79,6 (2)	67,7 (2)
300	80,4 (3)	72,0 (3)	84,7 (2)	-
leite em pó				
300	78,7 (3)	73,5 (3)	83,4 (2)	-
500	81,1 (3)	77,0 (3)	84,5 (2)	-

<sup>a</sup> - Proc. 980.21 da AOAC<sup>21</sup>

<sup>b</sup> - Proc. 974.17 da AOAC<sup>21</sup>

<sup>c</sup> - Proc. 980.21 da AOAC<sup>21</sup>

<sup>d</sup> - Método de Serralheiro & Quinta<sup>23</sup>

utilizam coluna cromatográfica para limpeza e o método que emprega tetracloreto de carbono<sup>22</sup>.

O método que utiliza coluna de C<sub>18</sub> foi o que apresentou a melhor recuperação da toxina, seguido de perto pelo que utiliza coluna de sílica gel. As porcentagens de recuperação situam-se dentro da faixa considerada aceitável para aflatoxina M<sub>1</sub><sup>20</sup>, especialmente considerando-se que os níveis testados estão baixos, e próximos do limite de detecção do método.

Tendo em vista os resultados obtidos, não recomendamos o uso da coluna de celulose que, além de utilizar grandes quantidades de adsorvente e de eluentes, revelou-se menos eficiente do que a coluna de sílica gel. A coluna C<sub>18</sub> é uma boa alternativa, mas trata-se de material caro e de difícil aquisição. Após o término deste estudo, tomamos conhecimento que o comitê da AOAC para toxinas naturais recomendou a retirada do método 974.17<sup>22</sup>, o que coincide com a nossa conclusão.

#### *Quantificação por Cromatografia em Camada Delgada*

Dentre as misturas de solventes utilizadas para CCD, as que promoveram as melhores separações entre AFM<sub>1</sub> e as outras substâncias foram clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) e éter etílico-metanol-água (95:4:1). O desempenho do éter etílico, no entanto, variou de uma marca para outra.

Devido ao fato de a sensibilidade requerida ser muito alta (ng/L), não foi possível utilizar-se placas cromatográficas preparadas em laboratório. O limite de detecção obtido utilizando-se placas preparadas foi de 2,5 ng de AFM<sub>1</sub>, chegando no caso das placas compradas, a 0,5ng.

Na tentativa de se melhorar a separação entre AFM<sub>1</sub> e os interferentes, utilizou-se a técnica do multidesenvolvimento, empregando-se primeiramente a fase móvel clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) e a seguir éter etílico-metanol-água (95:4:1). Observa-se que no caso das amostras de leite obteve-se boa separação, mas não melhor que a obtida com o desenvolvimento unidimensional utilizando-se apenas um dos solventes.

Para amostras de queijo, a utilização da CCD unidimensional e o multidesenvolvimento, não revelou-se eficiente na separação da AFM<sub>1</sub> dos interferentes, sendo necessário empregar a CCD bi-dimensional. Nesse caso usou-se primeiramente éter etílico-metanol-água (95:4:1), seguido por clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3). Esse é um procedimento

muito dispendioso, pois só permite a quantificação de uma amostra cada vez.

#### *Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*

Os cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 4) demonstraram a alta seletividade desse método, devido, principalmente, à derivação com TFA, a eficiente remoção dos interferentes e ao uso do detector por fluorescência. Este método foi o que apresentou maiores taxas de recuperação, como mostra a Tabela 5, mostrando que a extração em fase sólida foi eficiente (cartucho Sep-pak) e não houve perdas na limpeza em coluna de sílica gel e na derivação com TFA. Esta técnica revelou também maior sensibilidade, apresentando um limite de determinação bastante menor (25ng/L) que o obtido com CCD (150ng/L) para leite.

Os resultados obtidos nos levam a concluir que o método por CLAE é o mais adequado para determinação de AFM<sub>1</sub> e recomendar que a monitoração dessa toxina seja realizada preferencialmente por CLAE, apesar do alto custo, cabendo ressaltar, a título de comparação, que no caso das aflatoxinas B e G a CCD tem se mostrado perfeitamente adequada.

#### CONCLUSÕES

Dentre os solventes testados, o clorofórmio provou ser mais eficiente para a extração de AFM<sub>1</sub> em leite.

TABELA 5

Porcentagens de recuperação de AFM<sub>1</sub> em leite pasteurizado pelo método por CLAE.

QUANTIDADE ADICIONADA (ng/l)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO
100	90,5	4,6
150	91,2	4,5

Para a remoção efetiva dos interferentes é necessário o uso de coluna cromatográfica. Ao contrário das aflatoxinas B e G, para as quais a limpeza rápida com metais pesados tem sido bem sucedida, no caso da AFM<sub>1</sub> nenhum dos sais testados mostrou-se capaz de eliminar os interferentes presentes.

A CLAE apresentou taxas de recuperação, sensibilidade e especificidade maiores que a CCD.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

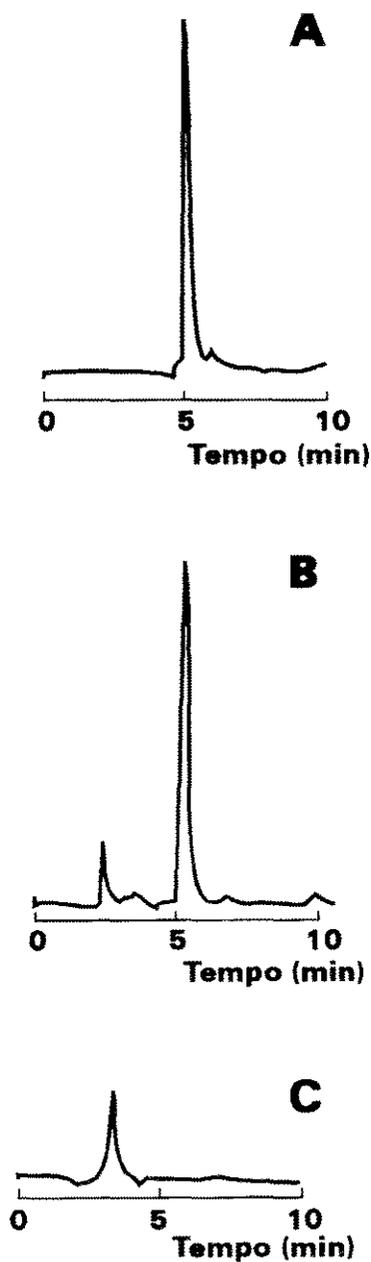


FIGURA 4

Cromatogramas característicos de um padrão de AFM<sub>1</sub>, derivado com TFA (A); de uma amostra de leite pasteurizado contaminada, derivada com TFA (B) e de uma amostra não contaminada, derivada com TFA (C). Condições cromatográficas: coluna LiChrospher 100 RP-18. 5 µm, (100 x 4,6 mm); fase móvel água-isopropanol-acetonitrila (80:12:8); vazão 0,5 ml / min; detector por fluorescência, excitação a 365 nm e emissão a 410 nm.

SYLOS, C. M. de e col. - Comparative study of methods to aflatoxin M<sub>1</sub> determination - *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 56(1):87-97, 1996.

SUMMARY: Various trials were carried out to choose the extracting solvent and the best technique for removing interfering substances from samples of milk for the TLC determination of aflatoxin M<sub>1</sub>. For extraction acetone, methanol and chloroform were utilized either singly, in combination with each other or with water. Precipitation with heavy metal salts, partition between immiscible solvents and conventional column chromatography were evaluated for clean-up. Heavy metals by themselves were not effective in eliminating interfering substances. The combined use of chloroform and a chromatographic column proved to be the most efficient procedure for extraction and clean-up. Columns packed with silica or silica-C<sub>18</sub> gave better results than that of cellulose. HPLC with solid phase extraction, clean-up in silica gel column and trifluoroacetic acid derivatization and fluorescence detection presented much higher sensitivity and specificity than TLC with visual quantification based on fluorescence intensity.

DESCRIPTORS: Aflatoxin M<sub>1</sub>, milk, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, analysis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLCROFT, R & CARNAGHAN, R.B.A.- Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet Rec.*, **75**(2):259-263,1963.
2. ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. - *The Reference* **17**(9):10, 1993.
3. BARNES, J.M. - Aflatoxin as a health hazard. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**:285-298,1970.
4. BULLERMAN, L.B. - Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Protec.* **42** (1): 65-86,1979.
5. CHAMBON, P.; DANO, S.D.; CHAMBON, R. & GEACHAN, A. - Rapid determination of aflatoxin M<sub>1</sub> milk and dairy products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **259**(2):372-374-1983.
6. COLE, R.J.; COX, R.H. - Handbook of fungal metabolites. *Academic Press Inc.*, New York, p. 29-31, 1981.
7. DOMINGUEZ, L.; BLANCO, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; RODRIGUEZ, E.F. & SUAREZ, G.- Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products contaminated at low levels. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**(3):470-472,1987.
8. FROBISH, R.A.; BRADLEY, B.D.; WAGNER, D.D.; LONG-BRADLEY, P.E. & HAIRSTON, H. - Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.*, **49**(10):781-785,1986.
9. HSIEH, D.P.H. - The role of aflatoxin in human cancer. In: STEYN, P.S., VLEGGAR, R. (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, p.447-456, 1986.
10. HOLADAY, C.E. - Rapid, screening method for aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**:1064-1066, 1981.
11. KROGH, P. - Mycotoxins in Food. *Academic Press Inc.*, London, p. 37-45, 1987.
12. MARSI, M.S.; GARCIA, V.C. & PAGE, J.R.- Aflatoxin M<sub>1</sub> content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. *Vet. Rec.*, **84**:146-147, 1969.
13. NABNEY, J. & BURBAGE, M.B. - Metabolism of aflatoxin in the lactating ewe. *Food Cosmet. Toxicol.*, **5**:11-17,1967.
14. POLAN, C. E.; HAYES, J. R. & CAMPBELL, T.C. - Consumption and fate of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactating cows. *J. Agric. Food Chem.*, **22**(3) 635-638, 1974.
15. PRICE, R.L., PAULSON, J.H.; LOUCH, O.G.; GINGG, C. & KURTZ, A.G. - Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. *J. Food Prot.*, **48**(1):11-15, 1985.
16. PURCHASE, I.F.H. - Acute toxicity of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in one-day-old ducklings. *Food Cosmet. Toxicol.*, **5**:339-342,1967.

17. ROMER, T.R. - Screening method for the determination of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**(3):500-506, 1975.
18. SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A. - Variation in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of the São Paulo, Brazil. *Food Additives Contaminants*, **6**(3):321-326, 1989.
19. SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Mycotoxin research in Brazil. *Ciência e Cultura (J. Brazilian Assoc. Advanc., Sci.)*, **46**(6) 359-371, 1993.
20. SCOTT, P.M. Methods of determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products a review of performance characteristics. *Food Additives Contaminants*, **6**(3):283-305, 1989.
21. SCOTT, P.M. - Natural Poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists.*, 15<sup>th</sup> ed., Arlington, Virginia, A.O.A.C., v.2, cap. 49, p.1184-1213. 1990.
22. SCOTT, P.M. - Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76**(1):112-119, 1993.
23. SERRALHEIRO, M.L. & QUINTA, M.L. - Rapid thin layer chromatographic determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in powdered milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**(5) : 952-954, 1985.
24. SINNHUBER, R.O.; LEE, D.J.; WALES, J.H.; LANDERS, M.K. & KEYL, A.C. - Aflatoxin M<sub>1</sub>, a potent liver carcinogen for rainbow trout. *Fed. Proc.* **29**:568 (Abstr. 1800), 1970.
25. SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B. - Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**(1): 22-26, 1989.
26. TUINSTRAL, L.G.M.; BRONGEEST, J.M. - Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk at the parts per trillion level. *J. Chromatography*, **111**:448-451, 1975.

DIAGNOSE MICROSCÓPICA DA FARINHA MÚLTIPLA CONSTITUÍDA DE FOLHAS DE *MANIHOT UTILISSIMA* POHL (MANDIOCA), *CUCURBITA PEPO* L. (ABÓBORA), *SECCHIUM EDULE* SWARTZ (CHUCHU), *IPOMOEA BATATAS* LAM. (BATATA-DOCE), *VITIS SP* (UVA) E *HIBISCUS ESCULENTUS* L. (QUIABO)\*

Luzia Ilza Ferreira JORGE\*\*  
Isabela Cristina de Araújo SILVA\*\*  
Luiza Marny LEE\*\*  
Márcia Dimov NOGUEIRA\*\*

RIALA6/802

JORGE, L.I.F.; SILVA, I.C.A.; LEE, M. & NOGUEIRA, M.D. - Diagnose microscópica da farinha múltipla constituída de folhas de *Manihot utilissima* Pohl (mandioca), *Cucurbita pepo* L. (abóbora), *Secchium edule* Swartz (Chuchu), *Ipomoea batatas* Lam. (batata-doce), *Vitis sp* (uva) e *Hibiscus esculentus* L. (quiabo). Rev. Inst. Adolfo Lutz, 56(1):99-104, 1996.

RESUMO: Vegetais ou partes de vegetais outrora desprezados vêm sendo empregados no preparo de "farinhas múltiplas" destinadas a complementar a parca alimentação da população carente. O presente trabalho tem por objetivo subsidiar a identificação dos componentes folhosos dessa farinha, fornecendo descrições e ilustrações dos elementos histológicos característicos das folhas de seis espécies vegetais: *Manihot utilissima* Pohl (mandioca), *Cucurbita pepo* L. (abóbora), *Secchium edule* Swartz (chuchu), *Ipomoea batatas* Lam. (batata-doce), *Vitis sp* (uva) e *Hibiscus esculentus* L. (quiabo).

DESCRITORES: *Manihot utilissima* Pohl, Mandioca, *Cucurbita pepo* L., Abóbora, *Secchium edule* Swartz, Chuchu, *Ipomoea batatas* Lam., Batata-doce, *Vitis sp*, Uva, Alimentação alternativa, Farinha múltipla, Multimistura.

## INTRODUÇÃO

Folhas outrora desprezadas ou destinadas à alimentação dos porcos, são atualmente aproveitadas com sucesso na recuperação de crianças desnutridas através das chamadas "multimisturas" descritas por Brandão & Brandão<sup>2</sup>. Frequentemente mais ricas em nutrientes do que as hortaliças tradicionais, as chamadas "folhas verde-escuras" constituem alimentação alternativa de baixo custo, extremamente oportuna nos dias de hoje, ante o desafio do combate à fome que se impõe em

diversas partes do mundo, e inclusive em nosso país. Embora isoladamente, diversos autores têm se dedicado à pesquisa da riqueza nutricional dessas folhas: ARIMA & RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, FRANCO<sup>3</sup>, HENSARLING ET ALII<sup>4</sup> E PETERS<sup>6</sup>.

No presente trabalho, selecionamos folhas de seis espécies vegetais, procedendo ao estudo das características histológicas das mesmas. Com isso possibilitamos seu reconhecimento quando pulverizadas ou fortemente fragmentadas, processamentos tecnológicos empregados na elaboração das "farinhas múltiplas" ou "multimisturas".

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

## MATERIAL & MÉTODOS

Folhas das espécies *M. utilissima* Pohl (mandioca), *C. pepo* L. (abóbora), *S. edule* Swartz (chuchu), *I. batatas* Lam. (batata-doce), *Vitis sp* (uva) e *H. esculentus* L. (quiabo), foram coletadas em chácaras do município de Taboão da Serra, SP.

Os cortes histológicos foram efetuados a mão livre, com emprego de medula de sabugueiro como suporte. Os desenhos foram executados sob projeção de câmara clara. A escala foi determinada com lâmina micrométrica. Floroglucina clorídrica, azul de metileno e lugol foram os corantes empregados para reconhecimento da constituição de paredes e inclusões celulares.

## RESULTADOS

### 1 - *Hibiscus esculentus* L. - (Quiabo)

Família: *Malvaceae*

-Epiderme superior - secção paradérmica (Fig. 1 - a)

Células de paredes ligeiramente onduladas recobertas de gotículas oleaginosas que se despreendem de células mucilaginosas subepidérmicas. Estômatos do tipo anomocítico, relativamente esparsos.

-Epiderme inferior - secção paradérmica (Fig. 1-b)

Mesma descrição anterior, porém, a frequência relativa dos estômatos é maior.

-Anexos epidérmicos e inclusões celulares (Figs. 1-c, 1-d, 1-e e 1-f)

Pêlo tector simples, unicelular, ápice afunilado e base abaulada, 500 µm de comprimento em média. Pelo glandular pluricelular com pedicelo curto (apenas uma célula). Presença de células mucilaginosas e de drusas no parênquima mesofílico.

-Lâmina foliar em secção transversal

Nervuras proeminentes em ambas as faces, sendo mais proeminentes na face inferior. Presença de colênquima abundante (cerca de 15 camadas celulares) ao nível de nervura central, de ambos os lados da folha. Células epidérmicas periclinalmente alongadas, de dimensões variadas. Mesofilo dorsiventral com duas camadas de parênquima paliçádico e várias camadas de parênquima lacunoso.

-Vasos (Fig. 1-g)

Calibrosos, dos tipos pontuado, espiro-reticulado e espiralado.

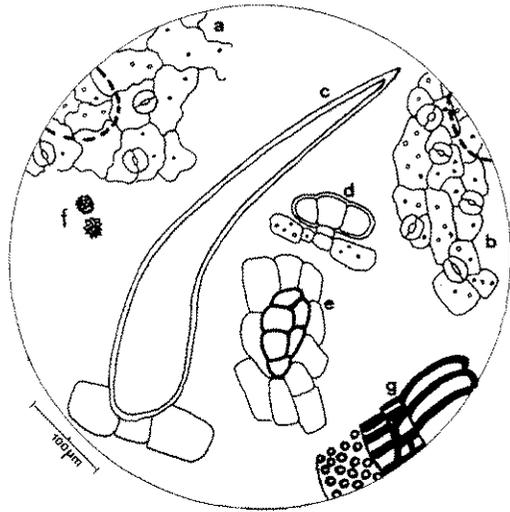


FIGURA 1

*Hibiscus esculentus* L. (QUIABO) - Elementos histológicos característicos da folha.

a - Epiderme superior; b - Epiderme inferior (célula mucilaginosa observada por transparência); c - Tricoma tector; d - Tricoma glandular; e - Tricoma glandular; f - Drusas; g - Vasos.

### 2 - *Secchium edule* Swartz - (chuchu)

Família: *Cucurbirtaceae*

-Epiderme superior - Secção paradérmica (Fig. 2-a)

Células de contorno sinuoso. Células mucilaginosas observadas por transparência.

-Epiderme inferior - Secção paradérmica (Fig. 2-b)

Mesma descrição anterior. Presença de estômatos do tipo anomocítico.

-Anexos epidérmicos e inclusões celulares (Figs. 2-c, 2-d, e 2-e)

Tricoma tector tricelular, de ocorrência predominante sobre as nervuras. Sua constituição é desproporcional: a célula basal é a maior, a apical é a menor e a mediana tem dimensões intermediárias em relação a ambas. Tricoma glandular com pedicelo constituído de duas células achatadas e cabeça constituída de oito células distribuídas em pares. Sua ocorrência é

predominante na região do limbo foliar. Drusas malformadas e cristais prismáticos são escassos.

-Lâmina foliar em secção transversal

As nervuras são salientes em ambas as faces, sendo mais salientes na face inferior. Há colênquima discreto de ambos os lados da nervura central, que apresenta três feixes vasculares individualizados em função da ausência de estrutura secundária, característica da família. Presença de estrutura "Kranz". O mesófilo é dorsi-ventral, com uma camada de parênquima paliádico, uma camada de células coleadoras e várias camadas de parênquima paliádico. As células epidérmicas são periclinalmente alongadas, sendo que as superiores são maiores do que as inferiores, o que não se observa no corte paradérmico.

- Vasos (Fig. 2-f)

Espiralados, de diversos calibres.

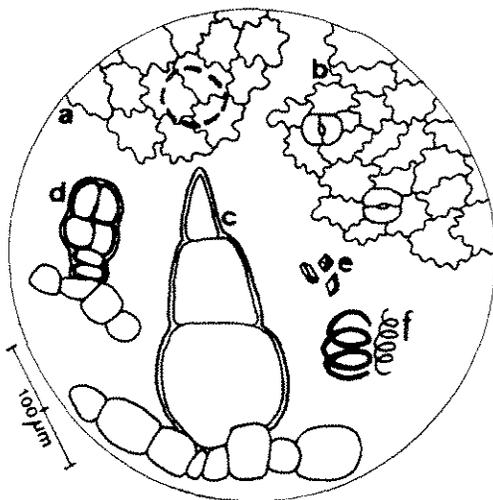


FIGURA 2

*Secchium edule* Swartz (CHUCHU) - Elementos histológicos característicos da folha.

a - Epiderme superior (célula mucilagínosa observada por transparência); b - Epiderme inferior; c - Tricoma tector; d - Tricoma glandular; e - Cristais prismáticos; f - Vasos espiralados.

3 - *Cucurbita pepo* L. (abóbora)

Família: *Cucurbitaceae*

-Epiderme superior - Secção paradérmica (Fig. 3-a)

Células de contorno anguloso, maiores que as da epiderme inferior, que têm contorno sinuoso. Estômatos escassos.

-Epiderme inferior - Secção paradérmica (Fig. 3-b)

Células de contorno sinuoso; guarnecida de estômatos anisocíticos (ou ranunculáceos). A presença de estômatos na epiderme superior é esporádica. Células secretoras sob os tricomas glandulares.

-Anexos epidérmicos e inclusões celulares (Fig. 3-c)

Pêlo glandular sésseil pluricelular (Fig. 3-b) e pêlo tector constituído de 3 a 5 células, com base reta e ápice afunilado, recoberto por cutícula estriada, cerca de 400 µm de comprimento.

-Lâmina foliar em corte transversal

O mesófilo é dorsi-ventral, com duas camadas de parênquima paliádico e três ou quatro camadas de parênquima lacunoso. As células epidérmicas são tangencialmente alongadas.

-Vasos (Fig. 3-d)

Espiralados, de diversos calibres.

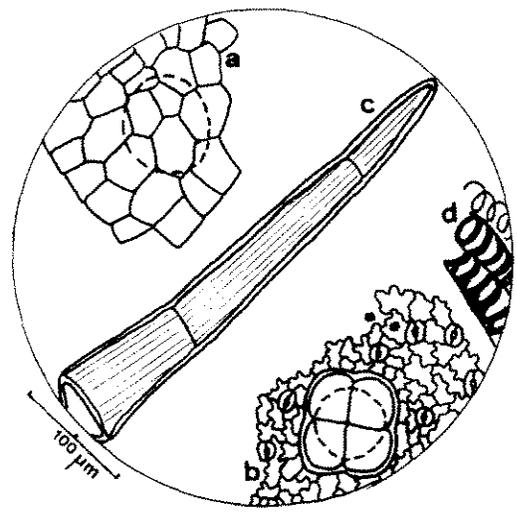


FIGURA 3

*Cucurbita pepo* L. (ABÓBORA) - Elementos histológicos característicos da folha.

a - Epiderme superior (célula mucilagínosa observada por transparência); b - Epiderme inferior (pêlo glandular sésseil); c - Tricoma tector; d - Vasos espiralados.

4 - *Vitis sp* (uva)

Família: *Vitaceae*

-Epiderme superior - Secção paradérmica (Fig. 4-a)

Células poligonais, de paredes retas, um pouco maiores do que as da epiderme inferior.

-Epiderme inferior - Secção paradérmica (Fig. 4-b)

Mesmos formatos que as da epiderme superior; porém, um pouco menores. Estômatos do tipo anomocítico, restritos à epiderme inferior.

- Anexos epidérmicos e inclusões celulares (Figs. 4-c, 4-d e 4-e)

Abundantes rafídeos, drusas esporádicas (Fig. 4-e). Tricoma tector triclular de base arredondada e ápice afunilado, cerca de 100 µm de comprimento. Tricoma vermiforme unicelular, paredes paralelas, base e ápice arredondados, 1,5mm de comprimento, em média.

- Lâmina foliar em secção transversal

Mesófilo dorsiventral, com uma camada de parênquima paliádico e várias camadas de parênquima lacunoso. Células epidérmicas tangencialmente alongadas. As nervuras são proeminentes de ambos os lados, com estrutura "Kranz" em torno do feixe vascular, e colênquima bi-facial abundante.

-Vasos (Fig. 4-f)

Espiralados, espiro-reticulados e pontoados.

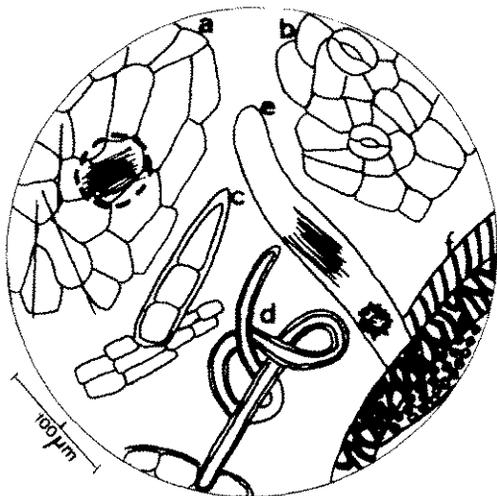


FIGURA 4

*Vitis sp* - (UVA) - Elementos histológicos característicos da folha.

a - Epiderme superior (rafídeos observados por transparência); b - Epiderme inferior; c - Tricoma tector triclular; d - Tricoma tector vermiforme; e - Idioblasto contendo rafídeos e drusa; f - Vasos.

5 - *Ipomoea batatas* Lam. (batata-doce)

Família: *Convolvulaceae*

-Epiderme superior - Secção paradérmica (Fig. 5-a)

Células de paredes angulosas. Estômatos do tipo paracítico (ou rubiáceos). Cutícula estriada.

-Epiderme inferior - Secção paradérmica (Fig. 5-b)

Mesma descrição anterior. Cutícula lisa.

-Anexos epidérmicos e inclusões celulares (Figs. 5-b e 5-c)

Tricoma glandular pluricelular de pedicelo curto. Ductos secretores calibrosos, de conteúdo pardacento, relacionados aos vasos. Cutícula espessa e detalhada reveste a epiderme superior. Drusas.

- Lâmina foliar em corte transversal

Nervuras duplamente proeminentes, sendo mais proeminentes na face inferior. Mesófilo dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliádico e várias camadas de parênquima lacunoso. Células epidérmicas tangencialmente alongadas, sendo as superiores maiores do que as inferiores. Ao nível de nervura central observa-se colênquima desenvolvido abaixo das epidermes e estrutura "Kranz" em torno do feixe vascular.

- Vasos (Fig. 5-c)

Espiralados calibrosos.

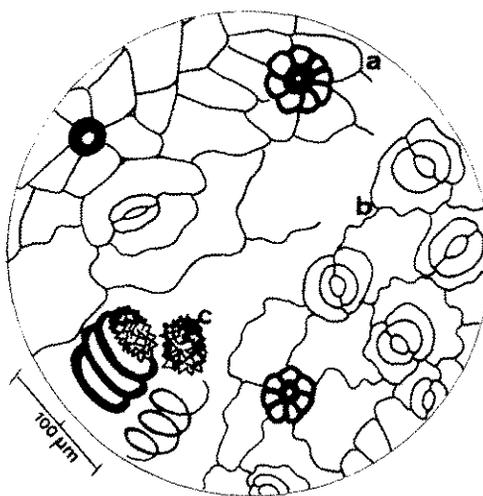


FIGURA 5

*Ipomoea batatas* Lam. (BATATA-DOCE) - Elementos histológicos característicos da folha.

a - Epiderme superior (fragmento contendo estômatos, pêlo grandular e ponto de inserção do pêlo grandular); b - Epiderme inferior (fragmento contendo estômatos e pêlo grandular); c - Vasos e drusas.

## 6 - *Manihot utilissima* Pohl (mandioca)

## DISCUSSÃO

Família: *Euphorbiaceae*

-Epiderme superior - Secção paradérmica (Fig. 6-a)

Células de paredes ligeiramente curvas e dimensões discretas.

-Epiderme inferior - Secção paradérmica (Fig. 6-b)

Células pequenas de paredes ligeiramente curvas, recobertas por "correntes" constituídas de papilas, discerníveis no corte transversal. Presença de estômatos de diversos tipos.

-Anexos epidérmicos e inclusões celulares (Figs. 6-c e 6-d)

Pêlo tector unicelular de base reta e ápice afunilado, comprimento de 80 a 250 µm. Drusas.

-Lâmina foliar em secção transversal

Mesófilo dorsiventral, com uma ou duas camadas de parênquima paliçádico e várias camadas de parênquima lacunoso. Estômatos restritos à epiderme inferior; epiderme inferior papilosa.

-Vasos

Espiralados, espiro-reticulados e pontoados.

É peculiar a coloração acastanhada resistente apresentada pelo tricoma de *H. esculentus* L. A presença de estrutura "Kranz" em *S.edule* Swartz ainda não tinha sido descrita para a família *Cucurbitaceae*, segundo Metcalfe & Chalk<sup>5</sup>, bem como a ocorrência de células mucilaginosas.

As dimensões relativas dos ostíolos parecem ser características com marcação genética, de importância diagnóstica (vide ostíolos grandes em *I. batatas* Lam. e pequenos em *S.edule* Swartz).

É muito intensa a pilosidade de *Vitis sp*, que se reflete macroscopicamente no aspecto aveludado ao tato que suas folhas apresentam. Ao nível microscópico, a presença de grande quantidade de pêlos vermiformes longos é notável.

## CONCLUSÕES

Pelas suas peculiaridades, formatos, coloração e detalhes, são característicos os seguintes elementos histológicos das "folhas verdes-escuras", empregadas na elaboração das "farinhas múltiplas":

*Hibiscus esculentus* L. (quiabo)

- Estômatos ranunculáceos; tricoma tector unicelular de base abaulada, lúmen extenso e coloração acastanhada; tricoma glandular de pedicelo curto e cabeça pluricelular; drusas e vasos calibrosos.

*Secchium edule* Swartz (chuchu)

-Células epidérmicas de contorno sinuoso, estômatos ranunculáceos, tricoma tector tri-celular de formato peculiar, tricoma glandular, células mucilaginosas, vasos espiralados.

*Cucurbita pepo* L. (abóbora)

-Células epidérmicas curvas (superiores), células epidérmicas sinuosas (inferiores), estômatos ranunculáceos, pêlo glandular sésstil, pêlo tector pluricelular com cutícula rugosa.

*Vitis sp* (uva)

-Células epidérmicas de paredes retas, estômatos ranunculáceos, tricoma tector curto constituído de três

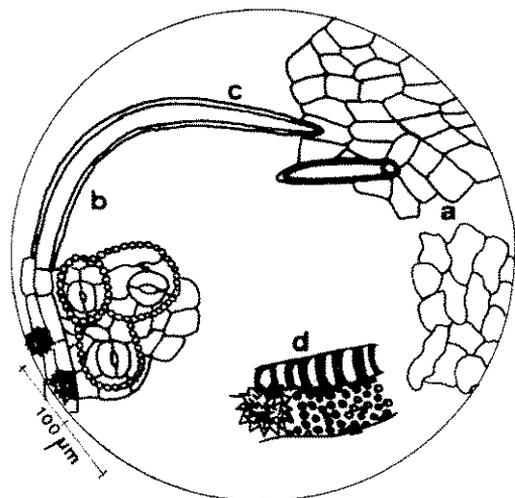


FIGURA 6

*Manihot utilissima* Pohl (MANDIOCA) - Elementos histológicos característicos da folha.

a - Epiderme superior; b - Epiderme inferior (fragmento destacando estômatos, pêlo tector, drusas e papilas em "correntes"; c - Tricoma tector; d - Vasos e drusas.

células, tricoma tector verniforme longo, rafídeos em abundância, algumas drusas.

*Ipomoea batatas* Lam. (batata-doce)

*Convolvulaceae*

-Células epidérmicas de contorno ligeiramente curvo, estômatos rubiáceos, cutícula estriada, tricoma glandular com cabeça constituída de oito células, ductos secretores e vasos espiralados calibrosos, presença de drusas.

*Manihot utilissima* Pohl (mandioca)

*Euphorbiaceae*

- Células epidérmicas de paredes ligeiramente curvas, estômatos de diversos tipos, epiderme inferior papilosa (aspecto de "pequenas correntes" em vista facial), drusas, tricoma tector unicelular.

RIALA6/802

---

JORGE, L.I.F.; SILVA, I.C.A.; LEE, L.M. & NOGUEIRA, M.D. - Microscopic diagnosis of the multiple flour constituted of leaves of *Manihot utilissima* Pohl (cassava), *Cucurbita pepo* L. (pumpkin), *Secchium edule* Swartz (chayote), *Ipomoea batatas* Lam. (sweet potato), *Vitis sp* (grape) and *Hibiscus esculentus* L. (okra). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):99-104, 1996.

ABSTRACT: Vegetables or parts of vegetables formerly displaced, are nowadays employed to make the multiple flour to complete the alimentation of the poor population. This paper intends to give data to identify the leafy compounds of this flour, giving descriptions and drawings of the characteristics histological elements of the leaves of six vegetable species: *Manihot utilissima* Pohl (cassava), *Cucurbita pepo* L. (pumpkin), *Secchium edule* Swartz (chayote), *Ipomoea batatas* Lam. (sweet potato), *Vitis sp* (grape) and *Hibiscus esculentus* L. (okra).

DESCRIPTORS: *Manihot utilissima* Pohl, cassava, *Cucurbita pepo* L., pumpkin, *Secchium edule* Swartz, chayote, *Ipomoea batatas*, Lam., sweet potato, *Vitis sp*, grape, *Hibiscus esculentus* L., okra, alternative alimentation, multiple flour, multiple mixture.

---

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIMA, H.K. & RODRIGUEZ, A.D.B. - Carotenoid composition and vitamin A value of comercial Brazilian squashes and pumpkins. *J. Micronutr. Anal.*, 4(3):177-91, 1988.
2. BRANDÃO, C.T. & BRANDÃO, R.F. - *Alimentação alternativa*. Gráfica e Editora Redentorista, Centro de Pastoral Popular, Goiânia, 68p.
3. FRANGO, G. - *Teor Vitamínico dos Alimentos*. Rio de Janeiro, Livraria José Olímpio, p. 93-129, 1968.
4. HENSARLING, T.P.; JACKS, T.J. & BOOTH, A.N. - Nutritive value of storage protein isolated from *Cucurbita foetidissima*. *J. Agr. Food Chem.*, 21(6):986-8, 1973.
5. METCALFE, C.R. & CHALK, L. - *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press, 2 vs., 1500 p., 1950.
6. PETERS, F.E. - Chemical composition of some South Pacific foods. *Qual. Plant. et Mat. Veg.*, 5:313-43, 1959.

## ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DE COCO RALADO COMERCIALIZADO A VAREJO E DE COCO *IN NATURA* COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS LEGAIS VIGENTES\*

Mário TAVARES\*\*

Márcia Regina P. do AMARAL-MELLO\*\*

Regina Sorrentino MINAZZI-RODRIGUES\*\*

Norberto Camilo CAMPOS\*\*\*

RIALA6/803

TAVARES, M. & col. - Estudo das características físicas e químicas de coco *ralado comercializado a varejo e de coco in natura* com relação aos parâmetros legais vigentes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):105-112, 1996.

**RESUMO:** Com o objetivo de averiguar o cumprimento da legislação vigente no Brasil, com relação às características físico-químicas, foram analisadas 42 amostras de coco ralado, de sete diferentes marcas, assim distribuídas quanto à designação e classificação: 6 de "coco ralado com baixo teor de gordura"; 12 "com médio teor de gordura"; 18 "com alto teor de gordura" e 6 "açucarado". Todas as amostras apresentaram data de fabricação, prazo de validade e/ou número de lote diferentes entre si, tendo sido obtidas no comércio das cidades de São Paulo, Santos e São Vicente/SP. As determinações realizadas incluíram umidade, acidez, lipídeos, sacarose e pesquisa de ranço, segundo métodos descritos nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz", 3ª ed., v. 1, 1985. Observou-se que 100% das amostras de coco ralado não atenderam às normas técnicas oficiais em, pelo menos, um dos parâmetros analisados. Das 42 amostras, 40(95%) estavam em desacordo quanto ao teor de sacarose, 29(69%) com relação à acidez, 19(45%) quanto aos lipídeos, 7(17%) com referência à umidade, sendo que nenhuma delas apresentou prova de ranço positiva. Foram também realizadas as mesmas determinações em 11 variedades de coco *in natura*, com o intuito de se obter dados que retratassem os valores naturalmente encontrados no fruto. Com base nos resultados obtidos, sugere-se uma ação fiscalizadora mais intensa sobre aquele tipo de produto, assim como revisão dos parâmetros legais em vigor, particularmente quanto ao teor máximo de sacarose estabelecido.

**DESCRIPTORIOS:** Coco, coco ralado, análise físico-química, legislação.

### INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes produtos comerciais fabricados a partir do coco é o coco ralado<sup>4,5</sup>. Este é obtido após a desintegração e desidratação do endosperma do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera*), através de uma tecnologia adequada, podendo ser parcialmente desengordurado e, opcionalmente, ser adicionado de outros ingredientes, coadjuvantes e aditivos permitidos para este produto e, finalmente, acondicionado de forma a assegurar sua perfeita conservação<sup>2</sup>.

No Brasil, a industrialização do coco ralado é baseada na remoção parcial do óleo ou do leite de coco,

sendo considerado um derivado ou resíduo da extração destes<sup>5,13</sup>.

A produção mundial de coco ralado, em 1989, foi de 150.000 toneladas<sup>1</sup>, sendo que o Brasil respondeu por apenas 4.000 toneladas. Os maiores produtores mundiais são as Filipinas e o Sri Lanka, seguidos pela Indonésia, Tailândia e Índia<sup>8,12</sup>.

O coco ralado é um dos ingredientes mais utilizados para manufaturados de sorvetarias, panificação, confeitaria e produtos derivados do leite, apresentando ainda grandes perspectivas futuras<sup>5,9</sup>.

\* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Trabalho parcialmente apresentado no Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 8ª, Porto Alegre, RS, 1993.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Bolsista de Iniciação Científica do Instituto Adolfo Lutz.

No sentido de controlar a qualidade do citado produto, foram estabelecidas normas técnicas no Estado de São Paulo, em 1978<sup>10</sup>, e em todo o território brasileiro, em 1979<sup>7</sup>. Entretanto, essas normas têm sido criticadas pelos produtores, especialmente quanto às características físicas e químicas fixadas, por não retratarem a realidade da composição do produto e da tecnologia empregada na sua industrialização. Por sua vez, as análises do produto em questão, efetuadas no Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, têm revelado não só os problemas apontados pelos fabricantes, como também uma certa discordância entre os valores encontrados e a denominação do produto declarada na rotulagem, levando o consumidor a adquirir, possivelmente, uma mercadoria não condizente com o nome apresentado no rótulo, em flagrante desrespeito ao Código de Defesa do Consumidor<sup>3</sup>.

Assim, o presente trabalho tem por objetivo averiguar o cumprimento da legislação vigente no Brasil, com relação às características físicas e químicas de coco ralado, bem como avaliar os parâmetros estabelecidos face aos resultados encontrados para as amostras comercializadas e para coco *in natura*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 42 amostras de coco ralado, de sete diferentes marcas, codificadas pelas letras A, B, C, D, E, F, G, assim distribuídas quanto à designação e classificação previstas na legislação: 6 de "coco ralado com baixo teor de gordura", 12 "com médio teor de gordura", 18 "com alto teor de gordura" e 6 "açucarado". Todas as amostras apresentaram data de fabricação, prazo de validade e/ou número de lote diferentes entre si, tendo sido obtidas no comércio das cidades de São Paulo, Santos e São Vicente/SP, no período de outubro de 1991 a abril de 1993.

Para o estudo do coco *in natura*, foram analisadas 11 variedades (dois frutos de cada), todas colhidas com 12 meses de maturação. As variedades

estudadas eram provenientes do Banco Ativo de Germoplasma do Campo Experimental do Betume, mantido pela EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, no município de Neópolis, Estado de Sergipe, e foram as seguintes: Gigante do Brasil Itaporanga D'Ajuda (GBRI); Gigante do Brasil da Praia do Forte-BA (GBRPF); Gigante da Malásia (GML); Gigante de Novas Hébridas (GNH); Gigante do Oeste Africano (GOA); Gigante da Polinésia (GPY); Gigante de Rennel (GRL); Gigante de Rotuma (GRT); Gigante de Tonga (GTG); Híbrido PB-111 (Anão Vermelho da Malásia, AVM x GOA); Híbrido PB-121 (Anão Amarelo da Malásia, AAM x GOA).

Foram ainda realizados estudos quanto à variação no teor de sacarose nas variedades PB-111 e PB-121, envolvendo dois estágios de maturação do fruto (10 e 12 meses), provenientes de um plantio localizado no município de Ananindeua, Estado do Pará, cuja produção se destina a fins industriais. O mesmo estudo com relação à variação no teor de sacarose foi também aplicado, em amostras obtidas de duas linhas de processamento, sendo uma de coco integral desidratado e outra de coco desidratado após a extração do leite.

As determinações realizadas no coco ralado foram: umidade, acidez, lipídeos, sacarose e pesquisa de ranço (reação de Kreis). No coco *in natura*, as análises foram efetuadas no endosperma, desprovido do tegumento, e incluíram as seguintes determinações: umidade, sacarose, lipídeos e acidez. Todos os métodos estão descritos nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"<sup>6</sup>.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise das 42 amostras de coco ralado encontram-se distribuídos nas tabelas 1, 2, 3, 4, a seguir, de acordo com a designação e a classificação do produto apresentada na sua rotulagem, assim como os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira.

TABELA 1  
Características físico-químicas de coco ralado com baixo teor de gordura.

Marca (código)	Umidade % (p/p)	Lipídeos % (p/p)	Sacarose % (p/p)	Acidez % (v/p)	Reação de Kreis
A-1	1,24	58,69	6,61	4,18	neg.
A-2	1,24	60,46	6,62	3,82	neg.
A-3	1,76	57,82	7,21	3,9	neg.
A-4	2,81	56,22	6,98	3,81	neg.
A-5	2,97	59,99	6,87	4,95	neg.
A-6	1,54	61,40	6,44	3,92	neg.
Média (A)	1,93	59,10	6,79	4,10	----
Legislação*	4**	40**	6**	3**	----

\* Ref. nº 2

\*\* Valores máximos

TABELA 2  
Características físico-químicas de coco ralado com médio teor de gordura.

Marca (Código)	Umidade % (p/p)	Lípídeos % (p/p)	Sacarose % (p/p)	Acidez % (v/p)	Reação de Kreis
B-1	1,35	58,25	8,46	3,78	neg.
B-2	1,69	62,80	9,56	3,63	neg.
B-3	1,61	61,64	9,90	3,16	neg.
B-4	0,92	62,24	8,79	3,30	neg.
B-5	1,66	56,27	9,76	3,23	neg.
B-6	1,27	61,20	8,02	4,00	neg.
Média (B)	1,42	60,40	9,08	3,52	---
C-1	1,25	65,80	8,49	3,67	neg.
C-2	1,19	59,87	9,34	3,66	neg.
C-3	1,24	65,90	6,78	3,85	neg.
C-4	1,47	55,72	6,04	3,86	neg.
C-5	0,92	63,78	6,82	3,75	neg.
C-6	1,67	61,20	6,85	3,40	neg.
Média (C)	1,29	62,04	7,39	3,70	---
Legislação*	4**	40-60	6**	3**	---

\*Ref. nº2

\*\* Valores máximos

TABELA 3  
Características físico-químicas de coco ralado com alto teor de gordura.

Marca (código)	Umidade % (p/p)	Lípídeos % (p/p)	Sacarose % (p/p)	Acidez % (v/p)	Reação de Kreis
D-1	2,72	62,40	13,35	2,43	neg.
D-2	2,21	57,81	16,42	2,79	neg.
D-3	3,42	57,40	18,72	2,38	neg.
D-4	2,95	56,45	18,30	1,90	neg.
D-5	2,68	67,02	8,95	3,00	neg.
D-6	3,86	61,82	12,92	2,48	neg.
Média (D)	2,97	60,48	14,78	2,50	---
E-1	3,21	56,58	6,98	3,88	neg.
E-2	3,62	58,33	7,52	3,00	neg.
E-3	3,09	60,29	8,72	3,03	neg.
E-4	2,08	61,79	7,75	4,43	neg.
E-5	3,16	66,65	9,20	4,70	neg.
E-6	2,65	69,44	6,18	3,80	neg.
Média (E)	2,97	62,18	7,73	3,81	---
F-1 <sup>1</sup>	2,60	70,15	5,56	3,40	neg.
F-2 <sup>1</sup>	2,25	68,65	6,09	3,95	neg.
F-3 <sup>1</sup>	2,65	60,41	6,64	4,78	neg.
F-4 <sup>1</sup>	3,19	66,79	6,33	4,09	neg.
F-5	4,23	67,83	8,19	5,80	neg.
F-6 <sup>1</sup>	3,31	67,17	8,82	4,35	neg.
Média (F)	3,04	66,83	6,94	4,40	---
Legislação *	4**	60***	6**	3**	---

\* Ref. nº 2

\*\* Valores máximos

\*\*\* Valor mínimo

<sup>1</sup> 'extra branco' (expressão declarada na rotulagem em vez de "alto teor de gordura")

TABELA 4

Características físico-químicas de coco ralado açucarado.

Marca (código)	Umidade % (p/p)	Lipídeos % (p/p)	Sacarose % (p/p)	Acidez % (v/p)	Reação de Kreis
G-1	5,88	37,07	40,92	2,33	neg.
G-2	7,66	30,94	40,84	2,49	neg.
G-3	4,66	36,33	43,92	2,60	neg.
G-4	6,15	33,29	43,84	2,40	neg.
G-5	8,25	24,68	45,73	2,43	neg.
G-6	8,88	30,00	43,88	2,43	neg.
Média (G)	6,91	32,05	43,19	2,45	----
Legislação*	4 **	----	30 **	3 **	----

\* Ref. nº 2

\*\* Valores máximos

Todas as amostras analisadas apresentavam características organolépticas normais, isto é, aspecto, cor, cheiro e sabor próprio, não apresentando ranço, confirmado pela reação de Kreis negativa, demonstrando que o processamento da matéria-prima vem sendo conduzido de maneira satisfatória, quanto à influência sobre estas características. A propósito, a literatura<sup>7</sup> refere que o coco, o óleo de coco e até o coco ralado podem se tornar facilmente rançosos devido ao acúmulo de metil cetonas alifáticas (rancidez cetônica), devendo ser controlada, particularmente, a umidade do coco ralado durante a estocagem.

Das 6 amostras da marca A (Tabela 1), comercializadas sob a denominação de "coco ralado com baixo teor de gordura", todas se encontravam em desacordo com os parâmetros legais vigentes quanto ao teor de lipídeos, sacarose e acidez, chamando atenção a acentuada diferença entre o teor médio de lipídeos obtido e o respectivo limite máximo estabelecido pela legislação; na verdade, não se enquadram na classificação declarada na sua rotulagem.

Para as 12 amostras das marcas B e C (Tabela 2), comercializadas como "coco ralado com médio teor de gordura", verificou-se que 67% do total apresentaram teor de lipídeos acima do limite máximo estabelecido para os produtos sob esta classificação; todas, neste caso também, apresentaram conteúdo de sacarose e acidez superior aos valores máximos estabelecidos.

Das 3 marcas (D, E, F), vendidas no comércio com a denominação "coco ralado com alto teor de gordura", apenas 28% não possuíam o teor mínimo de lipídeos exigido; quanto ao percentual de sacarose, neste caso novamente a maior parte das amostras (89%) estava acima do valor máximo exigido. No caso da marca D, inclusive, a maioria dos valores obtidos para este parâmetro era mais que o dobro do valor máximo fixado. Ressalta-se que, das 6 amos-

tras da marca F, apenas uma (F-5) era comercializada sob a denominação prevista nas normas técnicas, visto que as demais apresentavam a expressão "extra branco" em vez de "alto teor de gordura". Todavia, constatou-se que, por ocasião do registro no Ministério da Saúde, todas as cinco foram classificadas como "alto teor de gordura", conforme prevê a legislação.

Para as amostras de coco ralado açucarado, verificou-se que todas estavam em desacordo com a legislação quanto ao teor de umidade e sacarose. O conteúdo médio de lipídeos encontrado para estas amostras (marca G) foi 32,05%, embora as normas legais não estabeleçam limite para este parâmetro.

Assim sendo, observou-se que a totalidade das amostras não atendeu à legislação em, pelo menos, um dos parâmetros analisados.

A despeito das normas técnicas fixarem o valor máximo de umidade em 4%, a literatura<sup>8</sup> ressalta que, acima de 3% de umidade, fica comprometida a vida-de-prateleira do coco ralado.

Das 42 amostras, 40(95%) estavam em desacordo quanto ao teor de sacarose, 29 (69%) com relação à acidez, 19 (45%) quanto aos lipídeos e 7(17%) com referência à umidade.

Relativamente ao coco *in natura*, os valores obtidos para as determinações efetuadas em cada uma das 11 variedades encontram-se na Tabela 5.

O teor de umidade dos frutos variou de 39,21% (Gigante do Oeste Africano - GOA) a 53,44% (Gigante de Novas Hébridias - GNH).

O conteúdo de lipídeos, na base seca, oscilou de 42,22 a 72,66%, sendo que das 11 variedades estuda-

TABELA 5  
Características físico-químicas de 11 variedades de coco "in natura".

Amostra (Variedade)	Umidade <sup>o</sup> % (p/p)	Lipídeos* <sup>o</sup> % (p/p)	Sacarose* <sup>o</sup> % (p/p)	Acidez <sup>o</sup> % (v/p)
GBRI (Gigante do Brasil-Itaporanga D'Ajuda)	42,02	63,33	6,48	---
GBRPF (Gigante do Brasil-Praia do Forte)	45,36	66,03	5,04	---
GML (Gigante da Malásia)	41,33	70,63	6,32	3,07
GNH (Gigante Novas Hébridias)	53,44	42,22	9,17	2,32
GOA (Gigante Oeste Africano)	39,21	67,30	6,11	2,52
GPY (Gigante da Polinésia)	40,77	68,83	9,12	2,51
GRL (Gigante de Rennel)	50,06	63,05	9,95	2,67
GRT (Gigante de Rotuma)	45,70	65,97	9,47	---
GTG (Gigante de Tonga)	46,56	72,66	5,26	2,59
PB 111 (híbrido) (AVM x GOA)	43,20	66,78	6,91	2,42
PB 121 (híbrido) (AAM x GOA)	45,17	65,24	9,56	3,18

\* Valores calculados na base seca.

<sup>o</sup> Resultado da análise de 2 frutos de cada variedade.

das, 10 apresentaram teor de gordura acima de 60%, revelando-se apropriadas para a produção de coco ralado de alto teor de gordura. Se fossem destinadas à produção de coco ralado de baixo ou médio teor de gordura, as mesmas teriam de ser submetidas a uma extração máxima do leite, para que o resíduo (coco ralado) viesse a atingir um conteúdo de lipídeos conforme a classificação desejada.

Das 8 variedades analisadas quanto à acidez, observou-se que 2 apresentaram valores médios ligeiramente superiores às demais, ou seja, GML e PB-121. Ambas mereceriam atenção especial se fossem utilizadas para o processamento de coco ralado, visto que uma acidez elevada pode contribuir para o desenvol-

vimento de aroma característico de sabão, conhecido como "soapy flavour".

O teor de sacarose, calculado na base seca para fins comparativos, variou de 5,04% (Gigante do Brasil da Praia do Forte - BA, GBRPF) a 9,95% (Gigante de Rennel - GRL). Considerando que o coco ralado com alto teor de gordura desidratado, normalmente comercializado, contém em média 3% de umidade (Tabela 3), estas amostras estudadas, se industrializadas, apresentariam teor de sacarose variando de 4,89 a 9,65%.

Ao estabelecer um limite máximo de sacarose de 6%, presume-se que a legislação em vigor tenta evi-

tar a adição fraudulenta de xarope de açúcar ao produto, para aumentar o seu peso. Entretanto, com base no estudo realizado, verificou-se que nem todas as variedades apresentam teor de sacarose dentro do limite máximo. Nesses casos, tais amostras também estariam em desacordo com a norma técnica.

Os resultados obtidos nas determinações realizadas dentro de uma mesma variedade (PB-111 e PB-121), envolvendo dois estágios de maturação (10 e 12 meses), assim como do estudo sobre a influência do processamento (extração do leite) na composição do coco, encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

De acordo com o Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros - CPATC, da EMBRAPA, as variedades PB-111 e PB-121 destacam-se por forne-

rendimentos para o fabrico de coco ralado. Na prática, porém, apenas a variedade PB-111 confirmou esse fato, visto que, com a variedade PB-121, ocorreu o inverso, ressaltando-se que somente uma amostra de cada variedade foi analisada.

Com relação aos resultados obtidos, verificou-se que os teores de sacarose não variaram significativamente entre os dois estágios de maturação estudados e nem entre os cocos integral e extraído.

## CONCLUSÃO

Considerando o fato de que a totalidade das amostras analisadas apresentava pelo menos um dos parâmetros em desacordo com a legislação vigente, sugere-se uma ação fiscalizadora mais intensa sobre este tipo de produto.

TABELA 6

Características físico-químicas de 2 variedades de coco *in natura* com diferentes estágios de maturação.

Variedade (Estágio de maturação)	Umidade % (p/p)	Lipídeos* % (p/p)	Sacarose* % (p/p)	Acidez % (v/p)
PB 111 (10 meses)	46,64	61,71	6,00	3,62
PB 111 (12 meses)	49,14	62,80	8,65	3,91
PB 121 (10 meses)	48,87	63,52	8,94	3,50
PB 121 (12 meses)	46,62	58,02	9,04	4,17

\* Valores calculados na base seca.

TABELA 7

Características físico-químicas de coco desidratado integral e extraído, provenientes de um mesmo lote.

Tipo	Umidade % (p/p)	Lipídeos* % (p/p)	Sacarose* % (p/p)	Acidez % (v/p)
Integral	2,25	67,29	8,28	3,04
Extraído	1,95	56,47	8,65	2,86

\* Valores calculados na base seca.

cerem maior rendimento, além de serem mais precoces que as variedades gigantes com relação à produção de frutos.

Justifica-se o estudo com variedades de 10 e 12 meses de maturação por serem os estágios normalmente utilizados pela indústria, já que, segundo a literatura<sup>11</sup>, a partir do 10<sup>o</sup> mês a amêndoa do coco apresenta um aumento gradual no seu conteúdo de gordura alcançando o valor máximo no 12<sup>o</sup> mês, período em que o fruto atinge o pico de maturação, fornecendo os melhores

Com base nos resultados obtidos quanto ao teor de sacarose, propõe-se uma revisão do limite máximo estabelecido e que deva existir uma tolerância legal de até 10% para os cocos ralados classificados como baixo, médio ou alto teor de gordura, em substituição ao limite atual de 6%. Já para o coco ralado açucarado, a sugestão é de que seja mantido o limite máximo de 30%, salientando que os fabricantes observem o conteúdo de sacarose naturalmente presente no fruto, adequando, assim, a quantidade de açúcar a ser adicionada.

Tendo em vista a possibilidade de novas variedades de híbridos virem a ser produzidas, sugere-se um levantamento periódico de dados relativos à composição dos frutos, normalmente utilizados para industrialização, com fins de atualização dos parâmetros ora estudados.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Wilson Menezes Aragão, Chefe Adjunto Técnico do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros - CPATC, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA e à Eng<sup>a</sup> de Alimentos Katia C. Madruga Faraco, gerente de controle de qualidade da Socôco S.A. Indústrias Alimentícias, pelo fornecimento das amostras de coco in natura.

RIALA6/803

TAVARES, M.; AMARAL-MELLO, M.R.P. do; MINAZZI-RODRIGUES, R.S.M. & CAMPOS, N.C. - Evaluation of physicochemical characteristics of desiccated coconut in relation to Brazilian current legislation. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):105-112, 1996.

**ABSTRACT:** Forty two samples of desiccated coconut were analysed for their acidity, moisture, fat and sucrose contents and rancidity reaction, in order to verify if they were in accordance with Brazilian legislation. The samples were acquired in the market of São Paulo, Santos and São Vicente cities, Brazil, and were taken out from 7 different marks, including "low", "medium" and "high fat content" and "sugary" desiccated coconut. Results showed that 95% of the samples were in disagreement with the sucrose pattern, 69% with the acidity, 45% respect to the lipid content and 17% in relation to the moisture. None of the samples presented positive reaction for rancidity. It was also analysed, for the same itens, 11 varieties of fresh coconut, in order to get data about values naturally found in the fruits. The results indicate the necessity of a more intense fiscalization on this kind of product as well as a revision of Brazilian legal parameters, particularly with respect to the sucrose maximum limit.

**DESCRIPTORS:** Coconut, desiccated coconut, physicochemical analysis, legislation.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOURDEIX, R. - *La selection du cocotier (Cocos nucifera L) etude theorique et pratique optimisation des strategies d'amelioration genetique*. Tese - Doutorado - University of Paris - Sud Centre D'orsay. Paris, 193p., 1989.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc - Resolução Normativa nº 12/79, da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade, a que deve obedecer o coco ralado. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de maio de 1979. Seção I, pt. I, p.7547-9.
3. CÓDIGO DE DEFESA DO CONSUMIDOR E LEGISLAÇÃO CORRELATA. São Paulo, Secretaria de Defesa do Consumidor, 135p., 1991.
4. CORNELIUS, J.A. - Coconuts: a review. *Trop. Sci.*, 15(1):15-37, 1973.
5. De MARTIN, Z.J.; KATO, K.; TERUO, P.; TURATTI, J.M.; SANTOS, L.C. dos; SILVA, M.T.C. & MEDINA, J.C. - *Coco - Da cultura ao processamento e comercialização. Série Frutas Tropicais 5*. ITAL, Campinas. 1980, p. 183-255.
6. INSTITUTO ADOLFO LUTZ - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed., São Paulo, IMESP, v.1, p.21-45, 260, 1985.
7. KELLARD, B.; BUSFIELD, D.M. & KINDERLERER, J.L. - Volatile off-flavour compounds in desiccated coconut. *J.Sci Food Agric.*, 36:415-20, 1985.
8. MATHEW, A.G. - Processing of coconut in India. *J.Plantation Crops*, 19(2): 183-90, 1991.
9. RUEHRMUND, M.E. - Coconut as an ingredient in bakery foods. *Food Technol. in New Zealand*, 20(11):21, 23, 25, 1985.
10. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc - Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Aprova as normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de outubro 1978, p. 1(NTA 29).

11. SHIVASHANKAR, S. - Biochemical changes during fruit maturation in coconut. *J Plantation Crops*, 19(2): 102-19, 1991.
12. SWETMAN, A.A. & BROADBENT, J.H. - Sugar content variation of coconut prior to the manufacture of desiccated coconut in Sri Lanka. *Trop. Sci.*, 21(1):33-8, 1979.
13. TEIXEIRA, A.M.T.; MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F. de; OLIVEIRA, G.S.F. de & FIGUEIREDO, R.W. de - Estudo do processamento e estabilidade de coco ralado. *Bol. CEPPA*, 3(1): 32-41, 1985.

Recebido para publicação em 21/02/95

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CAFÉ TORRADO E MOÍDO PROCESSADO NA REGIÃO DE CAMPINAS, ESTADO DE SÃO PAULO\*

Nilva Ap. Ressinetti PEDRO\*\*  
Maria Irene Cibela BADOLATO\*\*  
Valéria Pereira da Silva FREITAS\*\*  
Paulo Flávio Teixeira CHIARINI\*\*

RIALA6/804

PEDRO, N.A.R.; BADOLATO, M.I.C.; FREITAS, V.P.S. & CHIARINI, P.F.T. - Avaliação da qualidade do café torrado e moído processado na região de Campinas, Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):113-117, 1996.

RESUMO: Foram analisadas 49 amostras de café torrado e moído, processados na região de Campinas, Estado de São Paulo, sendo determinados os teores de cafeína, extrato aquoso, resíduo mineral fixo, resíduo mineral fixo insolúvel em ácido clorídrico e impurezas (cascas e paus). Todas as amostras (100%) estavam de acordo com a legislação em vigor quanto ao exame químico e apenas 2 amostras (4%) apresentaram teores de cascas e paus acima de 1%, portanto, em desacordo com a legislação em vigor.

DESCRIPTORIOS: Café torrado e moído; Exame químico; Teor de cascas e paus; Legislação.

### INTRODUÇÃO

O café pertence à família das *Rubiaceae*, gênero *coffea*, sendo que as espécies cultivadas no Brasil são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* que são comumente denominadas de "café arábico" e "café robusto". O café arábico representa mais de 75% da comercialização internacional do café<sup>5</sup>.

Café é um dos alimentos naturais mais complexos do ponto de vista de composição química. Não apenas pelo fato de o grão de café conter grande variedade de constituintes químicos mas, principalmente, devido à interação que ocorre entre esses constituintes durante os estágios de processamento.

No grão de café encontram-se os cinco grupos de constituintes fundamentais: água, substâncias minerais, glicídios, lipídios e protídios<sup>9</sup>. Ao lado dessas substâncias cuja presença é comum a todas as plantas, outras foram caracterizadas, como os ácidos orgânicos (principalmente ácido clorogênico), os alcalóides cafeína e trigonelina, diversas vitaminas, etc.

Ao chegar na indústria, o café passa por processo de higienização, classificação e armazenamento<sup>5</sup>. A matéria-prima a ser processada será o resultado da mistura de diferentes cafés armazenados.

Durante o processo de torração, os cafés sofrem transformações físicas e químicas<sup>4,5,9</sup>. As transformações físicas são: escurecimento do grão decorrente; principalmente da reação de Maillard e caramelização, perda de peso por evaporação e pirólise, diminuição da densidade aparente e aumento do volume devido à liberação de CO<sub>2</sub> pela pirólise.

As transformações químicas são: diminuição de pH de 6,0 para 5,1 em função da transformação de carboidratos a ácidos orgânicos, transformação de praticamente todos os açúcares (caramelização), redução do ácido clorogênico, formação de compostos aromáticos importantes como o dimetilsulfeto, decorrente das desnaturações e decomposição parcial de proteínas, degradação parcial de amido e dextrinas, formação de furfural a partir de pentosanas contribuindo para o odor característico do café

\* Realização na Seção de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas.

torrado. A cafeína e o óleo praticamente não são afetados.

Atualmente já foram identificados mais de 1000 compostos voláteis em café torrado, responsáveis pelo aroma, que são compostos alifáticos, aromáticos, furanos, alicíclicos, tiofenos, pirazina, tiozóis, oxazóis e pirróis<sup>5</sup>.

A cafeína tem propriedade diurética, excita o sistema nervoso central, age sobre o sistema muscular e circulatório, principalmente sobre o músculo cardíaco. Tem pouco efeito sobre o tubo digestivo<sup>3,10</sup>.

As impurezas mais comuns no café torrado e moído são as oriundas do mau beneficiamento do fruto do cafeeiro para livrar a semente de seus envoltórios<sup>6</sup>, sendo mais freqüente a presença de cascas e paus, que pode ser determinada pelo método microscópico e cujo limite permitido pela legislação é de até 1% (um por cento)<sup>2</sup>.

Sendo o Brasil um dos maiores produtores de café do mundo, e ainda considerando a utilização do mesmo para fins de exportação e o alto consumo da bebida pela população, é essencial o estudo das características físico-químicas, assim como determinação de impurezas (cascas e paus) no café torrado e moído processado na região de Campinas, onde se localiza um grande número de torrefações de café, cujos resultados são fundamentais para subsidiar autoridades governamentais a concentrar esforços no controle de qualidade deste tipo de produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

*a) Material:* Foram analisadas 49 amostras de café, torrado e moído, de marcas diferentes, processados na região de Campinas, Estado de São Paulo, coletadas diretamente nas torrefações, no período de abril a setembro de 1994, sendo: 2 amostras de Amparo, 5 de Araras, 4 de Campinas, 2 de Divinolândia, 6 de Espírito Santo do Pinhal, 5 de Itapira, 1 de Limeira, 3 de Piracicaba, 1 de Pirassununga, 3 de Rio Claro, 2 de Santo Antônio do Jardim, 2 de São José do Rio Preto, 5 de São Sebastião da Gramma, 2 de Serra Negra, 5 de Socorro e 1 de Vargem Grande do Sul. Sete (7) dessas amostras não continham selo de pureza ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Torrefação de Moagem de Café).

*b) Métodos:* Foram determinados os teores de: cafeína, pelo método I.A.L., modificados segundo a referência 7; extrato aquoso, resíduo mineral fixo, resíduo mineral fixo insolúvel em ácido clorídrico a 10% v/v e exame microscópico segundo a metodologia descrita nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"<sup>11</sup>.

## RESULTADOS

Na Tabela I estão apresentados os valores encontrados para as determinações físico-químicas realizadas e para o exame microscópico.

Na Tabela II estão apresentados os valores da média, desvio padrão e amplitude de variação para as determinações físico-químicas.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Todos os cafés tiveram os valores de cafeína, extrato aquoso, resíduo mineral fixo e resíduo mineral fixo insolúvel em ácido clorídrico a 10% v/v, dentro dos valores estabelecidos pela legislação em vigor<sup>12</sup> que são: teores mínimos de 0,70% p/p para cafeína e de 0,20% p/p para extrato aquoso e teores máximos de 5% p/p para resíduo mineral fixo e de 1% para resíduo mineral fixo insolúvel em ácido clorídrico a 10% v/v.

Duas amostras (4%) apresentaram teores de cascas e paus acima de 1%, em desacordo com a legislação em vigor<sup>2</sup> que estabelece limite máximo de 1% para substâncias estranhas. Essas amostras não continham selo de pureza ABIC. Outras substâncias estranhas não foram encontradas.

De acordo com Menezes Jr.<sup>8</sup>, o teor de cafeína no café torrado deve estar na proporção de 0,70 a 1,50%, pressupondo café esgotado ou contendo substâncias estranhas não cafeinadas, aquele com valores abaixo de 0,70%. O café arábico possui teor de cafeína entre 0,90 e 1,20% e o café robusto entre 1,60 e 2,40%. Os valores encontrados em nossas determinações estão de acordo com o citado, tendo amplitude de variação de 0,94 a 1,91. De acordo com Alves e col.<sup>1</sup>, o extrato aquoso deve estar entre 20,72 e 35,88%. Quando a amostra apresenta valores inferiores, pressupõe-se estar parcialmente esgotada ou conter substâncias minerais; e para valores superiores denuncia presença de substâncias estranhas<sup>8</sup>. Os valores encontrados possuem amplitude de variação de 25,00 a 38,98%, sendo que apenas duas amostras possuem valores acima de 35,88%; uma delas apresentando também teores de cascas e paus elevados.

É natural esperar uma oscilação nos teores de cafeína e extrato aquoso, uma vez que o produto em pó oferecido ao consumidor é constituído de misturas de diferentes variedades e possui diferentes graus de torração, com a preocupação comercial de padronizar as qualidades rápidas e aromáticas que devem ser permanentes para cada marca comercial.

TABELA 1  
Resultados obtidos nos exames químico e microscópico das amostras de café torrado e moído.

Nº da Amostra	Extrato Aquoso (g/100g)	Cafeína (g/100g)	Resíduo Mineral Fixo (g/100g)	R.M.F. Insolúvel em HCl (g/100g)	Exame Microscópico
1	31,53	1,22	4,26	0,09	A
2	31,07	1,19	4,62	0,15	A
3	33,68	1,28	4,64	0,04	A
4	34,50	1,14	5,00	0,04	A
5	31,80	1,41	4,71	0,01	A
6	31,75	1,29	4,98	0,12	A
7	33,82	1,30	4,58	0,02	A
8	29,98	1,24	4,96	0,03	A
9	25,00	1,13	4,99	0,01	A
10	31,60	0,95	4,03	0,05	A
11	29,50	1,08	3,56	0,06	A
12	32,75	0,94	3,55	0,02	A
13	31,80	0,91	3,97	0,02	A
14	38,98	1,31	4,75	0,05	C
15	31,20	0,94	4,87	0,03	A
16	31,85	0,98	5,00	0,14	A
17	28,20	1,17	4,70	0,03	A
18	31,85	1,28	4,83	0,04	A
19	31,86	1,32	4,69	0,03	A
20	31,33	1,43	4,71	0,06	A
21	31,05	1,06	5,00	0,11	A
22	30,80	1,30	4,72	0,01	A
23	31,09	1,13	4,23	0,08	C
24	34,24	1,24	4,65	0,08	A
25	27,55	1,51	4,63	0,09	A
26	34,48	1,24	4,93	0,09	A
27	33,49	1,27	4,98	0,01	A
28	32,35	1,35	4,62	0,02	A
29	31,20	1,22	4,59	0,07	A
30	29,69	1,26	4,59	0,01	A
31	30,24	1,23	4,25	0,09	A
32	33,45	1,39	4,40	0,04	A
33	30,45	1,36	4,64	0,02	A
34	31,50	1,23	4,69	0,01	A
35	31,10	1,27	4,46	0,12	A
36	32,95	1,24	5,00	0,12	A
37	33,05	1,08	4,77	0,02	A
38	33,35	1,38	4,46	0,15	A
39	31,20	1,91	4,79	0,02	A
40	32,25	1,91	4,98	0,09	A
41	35,60	1,66	4,32	0,04	A
42	36,90	1,60	4,65	0,10	A
43	28,95	1,02	4,53	0,02	A
44	32,35	1,36	4,93	0,02	A
45	31,75	1,28	4,55	0,03	A
46	31,63	1,48	4,22	0,01	A
47	32,20	1,48	4,71	0,02	A
48	34,05	1,35	4,67	0,01	A
49	28,64	0,95	4,75	0,14	A

A = aprovado  
C = condenado

TABELA II  
Valores médios, desvio padrão e amplitude de variação com relação aos resultados físico-químicos

DETERMINAÇÕES	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO
cafeína	1,27	0,22	0,94 - 1,91
extrato aquoso	31,87	2,30	25,00 - 38,98
res. min. fixo	4,61	0,34	3,55 - 5,00
res. min. fixo insol. em ac. clorídrico 10%	0,05	0,04	0,01 - 0,15

De acordo com Menezes Jr.<sup>8</sup>, o resíduo mineral fixo no café torrado deve variar entre 3,74 e 4,38% e é composto por uma parte solúvel e outra insolúvel em ácido clorídrico 10% v/v, tendo como valor médio de 0,75% para o insolúvel e 3,31% para o solúvel, sendo que valores acima de 1% para a parte insolúvel em ácido clorídrico a 10% denuncia, principalmente, presença de areia. Os valores encontrados foram de 3,55 a 5,00%, com valor médio de 4,61% para o resíduo mineral fixo e de 0,01 a 0,15%, com valor médio de 0,04% para o resíduo fixo insolúvel em ácido clorídrico a 10%.

Podemos concluir que os cafés processados na região de Campinas são de boa qualidade, com relação aos parâmetros analisados.

#### AGRADECIMENTOS

Aos colegas José Leopoldo Ferreira Antunes, pelo cálculo estatístico e à Maria Martins Vieira, pela colaboração técnica no presente trabalho.

RIALA6/804

PEDRO, N.A.R.; BADOLATO, M.I.C.; FREITAS, V.P.S. & CHIARINI, P.F.T. - A quality evaluation of the toasted powder-coffee processed in Campina's region, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):113-117, 1996.

ABSTRACT: Forty-nine samples of roasted and ground coffee, processed in Campinas's region, São Paulo, Brazil, were analysed to verify the concentration of caffeine, water extract, ash, insoluble-ash in HCL and sticks and peels. It was concluded that 100% of the samples agreed with the chemical pattern. From the 49 samples, 2 (4%) had percentage of sticks and peels higher than that tolerated by pertinent Brazilian legislation (1%).

DESCRIPTORS: Roasted and ground coffee; chemical examination; microscopical examination; legislation.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, G.; CAMPOS, C.M.T; MORETTO, E.; PHILIPPI, J.M.S; ARCHER, R.M.B.; GOULART, R. e GOULART, M.M. - Controle de qualidade dos cafés comercializados em Santa Catarina no segundo semestre de 1986 - *Bol. Bromasc.*, 1(2): 72-80, 1989.
2. BRASIL, Leis, decretos, etc - Resolução nº 02 de 12 de janeiro de 1990, *Diário Oficial*, Brasília, 17 de janeiro de 1990.
3. FOBÉ, L.A. - Cafeína - *Rev. Téc. Alimentos e Bebidas*, (1/12) 32-35, 1966.
4. FOBÉ, L.A.; NERY, J.P. & TANGO, J.S. - Influência do grau de torração sobre a composição química do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. 2:251-268, 1967/68.
5. JARDINE, J.G. - Redução da viscosidade de extrato de café por processo enzimático. *Tese de Doutorado - Unicamp - Faculdade de Engenharia de Alimentos*, 1991.

6. LOPEZ, F.C. - Determinação do sedimento, cascas e paus no café torrado e moído. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34:29-34, 1974.
7. MELLO, M.R.P.A.; MINAZZI - RODRIGUES, R.S.; CARVALHO, J.B. e SHIROSE, I. - Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de cafeína em café. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*, 52(1/2): 89-95, 1992.
8. MENEZES JR, J.B.F. - Fraudes do café - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 12:5-34, 1952.
9. NERY, J.P. - Química do café - *Bol. Instituto Tecnologia Alimentos*, nº 1/2/3:24-34, 1964.
10. NORMALIZACION calidad consumidores - Cafeína - *Alimentaria*, 21(149): 80-86, 1984.
11. SÃO PAULO - Instituto Adolfo Lutz - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - vol. I - Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, 3ª edição, São Paulo, p. 189-197, 1985.
12. SÃO PAULO - Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de outubro de 1978, p.1 (NTA 44)

Recebido para publicação em 09/02/95