

ISSN 0073-9855

REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

SERIALA 6

VOLUME 57

NÚMERO 1

1998



Letras & Letras[®]

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

DIRETOR RESPONSÁVEL

Dr. Cristiano Corrêa de Azevedo Marques
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

NEUS SADOCCO PASCUET, Presidente
KIMIYO NONOYAMA
MARIA ALICE DA SILVA TELLES
MARIA LUISA BARBOSA
MARIANGELA TIRICO AURICCHIO
MÔNICA ARCON BATISTIC
PEDRO LUIZ SILVA PINTO
RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS
REGINA GOMES DE ALMEIDA
REGINA M. MORELLI SILVA RODRIGUES
THAÏS VALÉRIA MILANEZ, Secretária

SETOR DE PUBLICAÇÕES

ROCELY A. SOUZA BUENO

PRODUÇÃO

EDITORA LETRAS & LETRAS Ltda.

EDITOR
Carlos José Linardi

Endereço/ Address
Av. Ceci, 1945 – São Paulo - SP - Brasil
CEP 04065 - 003
Fone/Fax: (011) 577-5746
e-mail: letras@uol.com.br

Endereço/ Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
CEP -01246 – 902 – São Paulo – SP - Brasil
(Caixa Postal 1783 – CEP – 01059-970)

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

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

1941 - 1996, 1-56
1998, 57 (1)

ISSN 0073-9855

RIALA 6

CDD 614.07205
18

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

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

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

Os trabalhos deverão ser apresentados na forma de artigos ou comunicações científicas, em português, em três vias, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e um em disquete 3 1/2", indicando o editor de texto utilizado. Artigos em inglês poderão ser aceitos, a critério da Comissão de Redação das Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz.

Na elaboração do artigo, será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura:

Página de rosto

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

Texto

Título
Autores
Resumo em português
Descritores em português
Introdução
Material e Métodos
Resultados
Discussão
Conclusões
Agradecimentos (se for o caso)

Títulos em inglês
Resumo em inglês
Descritores em inglês
Referências bibliográficas

TÍTULO - Deverá ser curto e específico, indicando precisamente o conteúdo do artigo; no caso de ser necessário um título longo, recorrer a substituí-lo.

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 últimas legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº11, de 12 de 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 nº01/82, 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, 22p.)

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 conseguir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01, etc. ;
- (x) Quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

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

Todas as ilustrações 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 à nanquim preta, com papel vegetal, com letras e números escritos com normógrafos.

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

RESUMOS - Serão apresentados 1, 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 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, escritas em versal; assim, para um autor.... TAUNAY³¹ verificou.....; para dois autores..... LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando.....; para mais de dois autores: no trabalho de TSUNODA et all⁶; ou ainda... Segundo vários autores^{1,3,7,8}.

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

Para artigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico, abreviado (WORLD list of scientific periodicals, published in the years 1900 - 1960; edited by Peter Brown and George Burder Stratton, 4 ed., London, Butterworths, 1963 - 1965, 3 v.) em grifo, n° do volume, n° do fascículo (quando a numeração não for continuada), páginas inicial e final do artigo, data da publicação do volume do 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), n° da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, n° de páginas ou volumes (ou n° 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, Setor de Publicações.
2. A publicação de artigos na *Revista* está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto desta comissão.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. 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 denota 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 20 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator - secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no topo 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.

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(1):1-86 1998

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

SUMÁRIO / CONTENTS

Artigos

- 819 Artigo de divulgação - Ocorrência de Dengue no estado de São Paulo, Brasil.
Occurrence of Dengue in São Paulo state, Brazil, from 1986 to 1996.
Iray Maria ROCCIO, Ivani B. FERREIRA, Luiza Terezinha M. de SOUZA, Dulce Maria de SOUZA, Gizelda KATZ, Elza Keiko K. GUSHIKEN, Kumini H. Costa MENDES, Margarida G. BASSI, Vânia Martins F. DEL GUERCIO, Ciléia H. TENGAN, Marisa Zwicker GALIMBERTTI & Berenice Bustamante KAVAKAMA 7-12
- 820 Avaliação do diagnóstico laboratorial da doença meningocócica em pacientes internados em um hospital sentinela no município de Campinas/SP, 1988-1991.
Laboratorial diagnosis evaluation of meningococcal disease in hospitalized patients of a observed hospital in Campinas/SP, Brazil, 1988-1991.
Brígida KEMP, Marilú M. M. ROCHA & Lygia Busch IVERSSON 13-19
- 821 Hepatites crônicas por Vírus - Modelo de doença crônica de interesse em Saúde Pública.
Viral chronic hepatitis - A model for chronic diseases with major Public Health interest.
Venâncio Avancini Ferreira ALVES, Raimunda Telma de Macêdo SANTOS & Alda WAKAMATSU 21-24
- 822 Avaliação da qualidade de comprimidos revestidos e soluções orais de sulfato ferroso utilizados no tratamento de anemia ferropriva.
Quality control of ferrous sulphate tablets and oral solutions used on the iron-deficiency anaemia.
Mônica Arcon BATISTIC, Mariangela Tirico AURICCHIO & Blanca Elena Ortega MARKMAN 25-28
- 823 Desinfecção de água com radiação ultravioleta: eficiência bactericida.
Desinfection of water with ultraviolet radiation: bactericide efficiency.
Marco Roberto PIRES, Beatriz PISANI, Maria Ângela Garnica PRANDI & Marise SIMÕES ... 29-34
- 824 Efeito do ferro na biossíntese de Aflatoxina B₁ por *Aspergillus Flavus* IMI 190443 após inoculação em dois genótipos de amendoim.
Effect of iron on the biosynthesis of aflatoxin B₁ by *Aspergillus Flavus* IMI 190443 after inoculation in two peanuts genotypes.
Guilherme PRADO, Ignácio José de GODOY, Marize Silva de OLIVEIRA, Roberto G. JUNQUEIRA & Jovita Eugênia C. GUAZZINELLI MADEIRA 35-39

825	Teor de vitamina A em alimentos enriquecidos. Vitamin A concentration in enriched foods. Rosa Maria Duarte FÁVARO, Neusa Santesso GARRIDO, Wilma Delphina de Oliveira GAROTTI, Cristina Eico YOKOSAWA, Maria Helena IHA, Alceu Afonso JORDÃO & Helio VANNUCCHI	41-48
826	Avaliação, segundo determinações de impurezas, fraudes e matérias estranhas, do café torrado e moído produzido e/ou comercializado na região de São José do Rio Preto - São Paulo. Valuation, according to determination of impurity, fraud and extraneous materials, toasted and ground coff produced and/or traded in area of São José do Rio Preto - São Paulo. Rejane Alexandre Silva GRACIANO, Aparecida Klai RIBEIRO, Tereza Cristina Castilho GORAYEB & Marlene CORREIA	49-55
827	Efeito do processamento do milho em Grãos no nível de matérias estranhas encontradas no grits e fubá. The effect of processing corn grain pertaining to extraneous materials in grit and corn meal. Márcia Bittar ATUI, Flávio Antônio LAZZARI & Claydes de Quadros ZAMBONI	57-63
828	Comparação entre imunoensaio e cromatografia em camada delgada na determinação de aflatoxina, ocratoxina a e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. Comparison between immunoassy and: thin-layer chromatography for determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn and corn meal. Thais V. MILANEZ, Márcia Bittar ATUI & Flávio A. LAZZARI	65-71
829	Composição de carotenóides em nectarina (<i>Prunus Persica</i>) Brasileira. Carotenoid composition of Brazilian nectarine (<i>Prunus Persica</i>). Helena Teixeira GODOY & Délia B. Rodriguez AMYA	73-79
830	Matérias estranhas em doces de amendoim e de leite vendidos por ambulantes na cidade de São Paulo. Light filth in peanuts and "milk sweet" bars, sold by street merchants in city of São Paulo. Regina M. Morelli S. RODRIGUES, Marlene CORREIA, Márcia Regina FRANZOLIN & Domingos BAGGIO	81-86

OCORRÊNCIA DE DENGUE NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL, DE 1986 A 1996

Iray Maria ROCCO¹
Ivani Bisordi FERREIRA¹
Gizelda KATZ²
Luiza Terezinha Madia de SOUZA¹
Dulce Maria de SOUZA¹
Elza Keiko KIMURA-GUSHIKEN³
Kunimi Hashizume Costa MENDES⁴
Margarida Georgina BASSI⁵
Vânia Martins Fontes DEL GUERCIO⁶
Ciléa Hatsumi TENGAN²
Marisa Zwicker GALIMBERTTTI²
Berenice Bustamante KAVAKAMA²

RIALA 6/819

ROCCO, I.M. e col. - Ocorrência de Dengue no Estado de São Paulo, Brasil, de 1986 a 1996. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(1): 7-12, 1998.

RESUMO: Desde 1986 casos de dengue vêm sendo detectados no Estado de São Paulo. De abril de 1986 a agosto de 1996, foram testadas 61.816 amostras de casos suspeitos, dos quais 21.891 foram confirmados, sendo 20.720 autóctones. A confirmação foi feita por sorologia específica e/ou isolamento de vírus, critérios adotados pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. A incidência de dengue no período de 1987 a 1996 variou de 0,14 a 20,20 por 100.000 habitantes. As maiores incidências ocorreram nos verões de 1990/1991, 1995 e 1996. Nestes anos a transmissão ocorreu em 59, 101 e 114 municípios do Estado, o que representa 18,0%, 24,3% e 27,3% dos municípios com infestação domiciliar por *Aedes aegypti*. O sorotipo 1 foi o único identificado em casos autóctones até 1996, quando ocorreram dois isolamentos de Dengue tipo 2. Os dados apresentados analisam as atividades do sistema de vigilância epidemiológica relacionadas com a detecção de casos e diagnóstico laboratorial

DESCRITORES: Dengue, epidemia, casos autóctones.

INTRODUÇÃO

A Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo iniciou, em 1986, o programa de vigilância epidemiológica para dengue, doença de notificação compulsória, com a implantação de metodologia para os diagnósticos laboratorial, virológico e sorológico. Foi, também, estabelecido um sistema de informações entre o Instituto Adolfo Lutz (IAL-Central e Regionais), responsável por receber, processar e estocar amostras de soro; o Centro de Vig-

lância Epidemiológica (CVE), responsável pela coordenação da notificação e investigação dos casos, e a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), responsável pelo combate e controle dos vetores no Estado.

A partir de abril de 1986 começaram a ser notificados casos de dengue no Estado¹⁴, sendo confirmada a transmissão autóctone em março de 1987¹⁵. No Estado de São Paulo, apesar da presença do *Aedes albopictus* em vários municípios, até o momento, o *Aedes aegypti* é o único vetor responsável pela transmissão da doença. A primeira grande

¹ Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

² Centro de Vigilância Epidemiológica "Alexandre Vranjac", São Paulo, SP

³ Laboratório Regional de Presidente Prudente, SP

⁴ Laboratório Regional de Ribeirão Preto, SP

⁵ Laboratório Regional de São José do Rio Preto, SP

⁶ Laboratório Regional de Campinas, SP

epidemia aconteceu no verão de 1990/91, com início em Ribeirão Preto^{3,12}, atingindo 59 municípios. Devido às proporções epidêmicas alcançadas nesse período, a partir de 1993 teve início a descentralização do diagnóstico sorológico para os laboratórios regionais, iniciando com o de Ribeirão Preto e, posteriormente, Presidente Prudente, São José do Rio Preto e Campinas. O isolamento de vírus continuou a ser realizado somente pelo IAL Central.

Nos últimos 6 anos epidemias de dengue vêm ocorrendo todos os anos, com nítida variação sazonal, sendo as maiores incidências nos meses de verão. Este trabalho registra a presença do vírus Dengue no Estado de São Paulo, a partir dos primeiros casos em abril de 1986, até agosto de 1996. Os casos foram confirmados por isolamento de vírus e/ou sorologia, critérios adotados pela Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Definição de caso

Foram considerados casos suspeitos os pacientes que apresentavam febre e dois dos seguintes sintomas: cefaléia frontal ou retro-ocular, mialgia, artralgia, prostração, exantema e ter estado, nos quinze dias anteriores, em áreas onde estivesse ocorrendo transmissão da doença ou, infestadas pelo mosquito vetor. Os casos eram considerados confirmados pela comprovação laboratorial, fosse isolamento de vírus e/ou detecção de anticorpos.

Coleta das amostras

As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos, sem anticoagulante e, após retração do coágulo, centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm. As amostras de soro para isolamento de vírus foram enviadas ao laboratório em isopor com gelo seco ou comum ou, em balões de nitrogênio líquido. Na impossibilidade de remessa imediata eram estocadas em nitrogênio líquido ou freezer - 20°C. Aquelas destinadas à sorologia foram enviadas em gelo comum. Todas as amostras eram acompanhadas da requisição de exame constando informações como nome, idade, sexo, endereço, data do início dos sintomas da doença, data da coleta da amostra e município requisitante.

Ficha epidemiológica

As unidades de saúde eram responsáveis pela notificação do caso e preenchimento de uma ficha epidemiológica (padronizada pelo CVE), constando de: identificação do paciente (nome, sexo, idade, endereço), dados epidemiológicos (local provável de infecção, data do início dos sintomas, autoctonia ou não, vacina para Febre amarela, infecção anterior por Dengue), dados clínicos (sintomas) e evolução da doença. Estes dados eram encaminhados para o CVE.

Isolamento de vírus

As tentativas de isolamento do vírus foram realizadas com amostras de sangue (soro) colhidas até o 5º dia do início dos sintomas da doença e inoculadas em culturas de células de mosquitos. De 1987 até 1989 foram utilizadas as células TRA-284-SFG (*Toxorynchitesamboinensis*)⁹ crescidas em meio Leibovitz (L-15) e triptose fostato em partes iguais. A partir de 1989, devido ao crescimento lento, baixo rendimento nos repiques e o grande número de células com grumos, foram substituídas pelas células C6/36 (clone de *Aedes albopictus*)⁸ semeadas em tubos com meio Leibovitz suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10 % de triptose fosfato, 10% soro bovino fetal, 100U/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina. Os procedimentos sempre foram os mesmos para ambas as células: os tubos inoculados foram incubados por 10 dias a 28°C. Em seguida foram submetidos ao teste de imunofluorescência direta com conjugado anti-flavivírus e os positivos foram tipados por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais para os 4 sorotipos^{4,7}.

Diagnóstico sorológico

Foram usadas, de 1986 a 1990, as técnicas MAC-ELISA¹⁰ para detecção de anticorpos da classe IgM e a de Inibição de Hemaglutinação (HI)¹, com amostras pares de soro, para observação do aumento dos títulos de anticorpos da classe IgG. As amostras pares processadas por HI foram consideradas positivas quando houve conversão sorológica, ou seja, aumento de 4 vezes no título da segunda amostra em relação ao título da primeira. Os antígenos utilizados nas reações sorológicas foram produzidos a partir de cérebros infectados de camundongos albinos Swiss lactentes, processados pelo método de extração por sacarose-acetona¹. Na técnica de MAC-ELISA foram usadas 16 unidades hemaglutinantes do antígeno e na de HI 4 unidades. Em MAC-ELISA usou-se um "pool" de antígenos de Dengue 1 e Dengue 2. Nos testes de HI foi utilizada uma bateria de antígenos composta por 6 Flavivirus, 2 Alphavirus e 1 Bunyavirus. Tanto em MAC-ELISA como em HI foram feitos controles positivos e negativos. A partir de 1991, em razão do aumento do número de casos, passou-se a utilizar somente a técnica de MAC-ELISA, com amostras únicas, colhidas a partir do 5º dia do início dos sintomas. O teste de HI passou a ser utilizado somente quando o diagnóstico não era conclusivo com apenas uma amostra de soro, sendo então solicitada a segunda amostra.

Os resultados eram anotados nas fichas epidemiológicas para estudos posteriores.

RESULTADOS

A incidência de dengue no período de 1987 a 1996 variou de 0,14 a 20,20 por 100.000 habitantes. As mai-

ores incidências ocorreram nos verões de 1990/1991, 1995 e 1996 (tabela 1). Nestes anos a transmissão ocorreu em 59, 101 e 114 municípios do Estado (dados CVE), o que representa 18,0%, 24,3% e 27,3% dos municípios com infestação domiciliar por *Aedes aegypti* (dados SUCEN).

TABELA 1

Casos autóctones e incidência (por 100.000 hab.)^a de dengue no Estado de São Paulo 1987 - 1996.

Ano	Casos	Incidência
1987	46	0,14
1988	-	-
1989	-	-
1990	3.038	9,66
1991	3.663	11,65
1992	38	0,12
1993	638	1,95
1994	684	2,06
1995	5.798	17,20
1996 ^b	6.815	20,20

^a Dados de população: SEADE

^b Dados até agosto de 1996

Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE

Pela tabela 2 verifica-se que 93,80 a 99,20% dos casos foram confirmados somente pelo teste de MAC-

ELISA. O teste de HI mostrou-se eficiente no período em que foi utilizado mas, exigia a coleta da segunda amostra de sangue, o que nem sempre era possível. Sendo assim, a realização dessa metodologia em conjunto com MAC-ELISA foi mantida somente até 1990, quando o volume de amostras por dia, superior a 700, inviabilizou a continuidade do HI. Nesse mesmo período a porcentagem de isolamento de vírus variou de 0,30 a 4,60% dos casos analisados em cada ano. Os dados apresentados nesta tabela mostram, ainda, a variação do percentual de resultados obtidos nos testes sorológicos e isolamento de vírus realizados com a mesma amostra de soro.

Analisando o período de 1993 a 1995, considerando os municípios com transmissão e o número de casos autóctones (tabela 3), verifica-se que a média de casos por ano variou de 29,1 a 57,4 com incidência média de 38,3 a 151,6. Apesar da progressão ser a mesma em 1994/95 (3,7 semanas), a duração da epidemia foi bem maior em 1995 (10,9 semanas).

Observa-se, na tabela 4, que houve aumento no percentual dos casos confirmados, detectados até 15 dias após o início dos sintomas: de 84% em 1994 para 90,3% em 1995 e uma queda na detecção tardia (> 16 dias), de 16% em 1994 para 9,7% em 1995.

TABELA 2

Distribuição dos casos de dengue, segundo o critério de confirmação, no Estado de São Paulo, 1990 - 1996

Ano	Critério de confirmação							
	Sorologia MAC-ELISA		Isolamento de vírus		Sorologia + Isol. de vírus		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1990	2.927	96,20	90	3,00	24	0,82	3041	100,00
1991	3.910	98,50	43	1,10	15	0,40	3968	100,00
1992	61	93,80	3	4,60	1	1,60	65	100,00
1993	651	99,20	2	0,30	3	0,50	656	100,00
1994	699	95,90	23	3,10	7	1,00	729	100,00
1995	5.967	98,50	60	1,00	26	0,50	6.053	100,00
1996 ^a	7.005	99,00	21	0,30	51	0,70	7.077	100,00

^a Dados Até agosto de 1996

Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE

TABELA 3

Incidência, duração, progressão e regressão da epidemia de dengue no Estado de São Paulo, 1993 - 1995

Ano	Média				
	Nº de casos ^a	Incidência ^b	Duração ^c	Progressão ^c	Regressão ^c
1993	44,1	86,4	5,9	2,9	3,9
1994	29,1	38,3	6,5	3,7	2,8
1995	57,4	151,6	10,9	3,7	7,2

^a Por 100.000 habitantes

^b Total de casos/ nº de municípios com transmissão

^c Média de semanas; Duração: tempo entre o primeiro e o último caso; Progressão: tempo entre o primeiro caso e o ápice da epidemia; Regressão: tempo entre o ápice da epidemia e o último caso

Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE

TABELA 4

Distribuição dos casos de dengue, segundo intervalo de tempo entre início dos sintomas e coleta de amostra, no Estado de São Paulo, 1993 - 1995

Ano	Detecção ^a					
	Precoce		Intermediária		Tardia	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1993	105	17,00	252	40,80	261	42,20
1994	231	35,10	322	48,90	105	16,00
1995	2.027	35,20	3.177	55,10	562	9,70

^a Detecção = Período entre a data início dos sintomas e a data da coleta da amostra; Precoce = 0-5 dias;

Intermediária = 6-15 dias; Tardia = acima de 16 dias

Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE

A figura 1 mostra que, nos últimos dois anos, somada ao aumento da incidência de casos, a transmissão passou a ocorrer em um período mais extenso, prolongando-se até os meses de junho/julho.

A Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do IAL Central e seus Laboratórios Regionais receberam amostras de sangue de 61.816 casos suspeitos, dentre os quais 21.891 foram confirmados laboratorialmente. Destes 20.720 foram considerados autóctones, segundo os dados registrados nas fichas epidemiológicas (tabela 5).

DISCUSSÃO

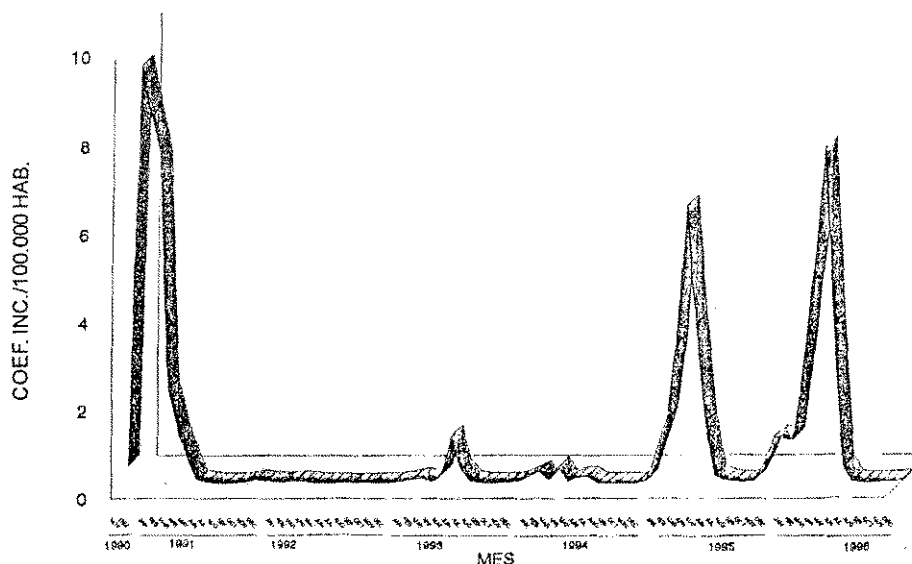
No Estado de São Paulo, desde 1986, dengue é doença de notificação compulsória devido à ocorrência de epidemias, causadas pelo sorotipo 1, nos Estados do Rio de Janeiro^{2,11}, Alagoas e Ceará³. Em razão da proximidade geográfica com o Rio de Janeiro e a intensa circulação de

peças entre os dois Estados, era previsível a introdução do vírus em São Paulo. Naquele ano com a implantação da metodologia de diagnóstico laboratorial, foi possível a confirmação de 32 casos importados.

A transmissão autóctone foi confirmada, laboratorialmente, em 1987, no distrito rural de Ribeirão do Vale (Município de Guararapes) e em Araçatuba com 30 e 16, casos respectivamente¹⁵. Os casos ficaram restritos a esses municípios em decorrência da agilidade nas medidas de controle. Nos anos subsequentes foram confirmados apenas casos importados.

No verão de 1990/91 foi registrada uma epidemia de grandes proporções com início em Ribeirão Preto e que, rapidamente, se expandiu para municípios vizinhos e outras regiões. A partir de então, as epidemias de dengue vêm ocorrendo todos os anos no Estado.

Analisando a tabela 1 observa-se que no período de 1992 a 1994, houve uma redução da incidência da doença



SVE/CVE/ DIV. DE ZOOSE
POP: ESTIMATIVA SEADE

Figura 1: Incidência mensal dos casos de Dengue Estado de São Paulo - 1990 a 1996*

TABELA 5

Casos suspeitos e confirmados de dengue no Estado de São Paulo, 1986 - 1996

Ano	Casos				
	Suspeitos	Autóctones	Importados	Total de Confirmados	% de Confirmados
1986	619	-	32	32	5,20
1987	1.729	46	277	323	18,70
1988	334	-	10	10	3,00
1989	527	-	10	10	1,90
1990	7.188	3.038	5	3.043	42,30
1991	13.011	3.663	239	3.902	30,00
1992	1.475	38	28	66	4,50
1993	3.064	638	17	655	21,40
1994	3.824	684	36	720	18,80
1995	16.448	5.798	255	6.053	36,80
1996*	13.597	6.815	262	7.077	52,00
Total	61.816	20.720	1.171	21.891	-

*Dados até agosto de 1996

Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE

quando comparada com 1990/1991. A partir de 1995 a incidência volta a aumentar, atingindo níveis em torno de 20,20 por 100.000 habitantes em 1996. Os dados desse ano revelam-se preocupantes tendo em vista que até o mês de agosto a incidência já era mais elevada que em 1995.

Quando se compara a incidência anual da doença com os percentuais de isolamento de vírus (tabela 2), nota-se que nos anos de maior transmissão, os profissionais vinculados à assistência médica priorizaram a confirmação do diagnóstico por meio da sorologia (MAC-ELISA) por ser este método mais rápido. Tais dados demonstram a necessidade de se implementar a vigilância, direcionando a coleta de exames para o isolamento de vírus. Esta atividade é prioritária em municípios que já tiveram transmissão de Dengue 1, pois sabe-se que infecções sequenciais por sorotipos diferentes são um fator de risco para a ocorrência de casos de Dengue Hemorrágico e Dengue com Síndrome de Choque (DHF/DSS)^{5,6}. O conhecimento precoce do sorotipo circulante auxilia na priorização das medidas de controle.

A extensão das epidemias no período de 1993 a 1995, mostra um aumento em 1995 (tabela 3) devido à transmissão da doença em municípios de grande porte (> 100.000 habitantes), onde o reduzido contingente de recursos humanos não permitiu agilidade nas medidas de controle do vetor, como vinha sendo feito em anos anteriores.

Por outro lado, apesar da epidemia de 1995 ter uma duração maior (tabela 4), houve um aumento no percentual de casos confirmados e detectados até 15 dias após o início dos sintomas e diminuição no percentual de detecção tardia. Estes dados atestam um melhor desempenho do sistema de vigilância epidemiológica do Estado.

O sorotipo 1 foi o único identificado em casos autóctones até 1996, porém o Dengue tipo 2 tem sido isolado de casos importados desde 1991. A introdução deste sorotipo

só ocorreu no Estado em 1996, quando foi isolado em dois municípios com transmissão.

Analisando as fichas epidemiológicas dos casos autóctones em 1995, em relação aos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes, observou-se 96,3% de febre, 90,0% de cefaléia, 86,1% de mialgia, 79,7% de artralgia, 72,1% de dor retro-orbital e 48,2% de exantema.

Dos 626 municípios do Estado, em 112 houve transmissão de dengue. Até o momento, os municípios onde ocorre transmissão estavam infestados, principalmente pelo *Aedes aegypti*. São importantes estudos da competência vetorial do *Aedes albopictus*, uma vez que o mesmo avança, rapidamente, por todo o Estado.

A qualidade da coleta, acondicionamento e transporte das amostras, bem como as informações constantes das requisições dos exames são importantes para garantir a sensibilidade e a especificidade dos testes realizados. Portanto, os profissionais de saúde, que trabalham na vigilância de Dengue, devem estar atentos para essa questão.

A proposta da criação de uma rede de laboratórios para o diagnóstico sorológico foi amplamente discutida dentro da Secretaria do Estado da Saúde, antes de ser implantada. Hoje, pode-se avaliar como positiva essa descentralização que permitiu uma participação efetiva dos laboratórios junto às outras unidades de saúde de sua região, agilizando o processamento das amostras e o retorno dos resultados. O controle de qualidade foi, sem dúvida, a preocupação constante, o que permitiu a obtenção de resultados tão positivos. O Laboratório Central do IAL teve, desde o início, o cuidado de padronizar aparelhagens e reagentes, além de estruturar um controle periódico retestando 10% das amostras positivas e negativas, processadas pelos regionais. Atualmente, o controle é realizado segundo o modelo da OPAS, onde um painel de soros não identificados, preparados pelo Laboratório

rio Central é enviado para cada regional e os resultados possibilitam realizar um controle de qualidade dos exames.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários do Instituto Adolfo Lutz e aos do Centro de Vigilância Epidemiológica

que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os funcionários da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos pelo suporte laboratorial, em especial à Antonia Torres Marti, Sandra Regina Mayer e Flávio de Oliveira Miguel. Agradecem também ao Dr. Luiz F. de Salles Gomes pela leitura deste manuscrito.

RIALA6/819

ROCCO, I.M. et al - Occurrence of Dengue in São Paulo State, Brazil, from 1986 to 1996. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(1): 7-12, 1998.

ABSTRACT: Since 1986 cases of dengue have been reported in São Paulo State. From April 1986 until August, 1996, were tested 61,816 samples of suspected cases, 21,891 of which were confirmed, 20,720 of them, autochthonous. The confirmation was made by specific serology and/or virus isolation, criteria established by the Secretary of Health of São Paulo State. The dengue incidence from 1987 to 1996 varied from 0,14 to 20,20 per 100,000 inhabitants. The major incidence occurred during the summers of 1990/1991, 1995 and 1996. In these years the transmission occurred in 59, 101 and 114 State's municipalities and represents 18,0%, 24,3% and 27,3% of the municipalities with domiciliar infestation by *Aedes aegypti*, when Dengue 2 was isolated from two samples. The present data analyse the activities of the epidemiological vigilance system in relation to the cases detection and laboratorial diagnosis.

DESCRIPTORS: Dengue, epidemic, autochthonous cases

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLARKE, D.H. & CASALS, J. - Technique for hemagglutination with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561-573, 1958.
2. DIETZ, V.J. et alii - Epidemic Dengue-1 in Brazil, 1986. Evaluation of clinically based dengue surveillance system. *Am. J. Epidem.* 131: 693-701, 1990.
3. FIGUEIREDO, L.T.M. et alii. - Estudos sobre o diagnóstico laboratorial e sintomas do dengue durante epidemia ocorrida na Região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 34: 121-130, 1992.
4. GUBLER, D.J. et alii. - A mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 158-165, 1984.
5. HALSTEAD, S.B. - Pathogenesis of dengue: challenge to molecular biology. *Science* 239: 476-480, 1988.
6. HALSTEAD, S.B. - Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage; A pathogenetic cascade. *Reviews of Infections Disease*, Vol. II, supplement 4, May-June, 1989.
7. HENCHAL, E.A. et alii. - Dengue virus-specific and flaviviruses group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 830-836, 1982.
8. IGARASHI, A. - Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.* 40: 531-544, 1978.
9. KUNO, G. - Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum-free medium. *J. Clin. Microb.* 16: 851-855, 1982.
10. KUNO, G. et alii. - Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 153-159, 1987.
11. MIAGOSTOVICH, M.P. et alii - Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 35 (2): 149-154, 1993.
12. PONTES, R.J.S. et alii. - Epidemia de Dengue em Ribeirão Preto, SP, Brasil: Nota prévia. *Rev. Saúde públ., S. Paulo*, 25: 315-317, 1991.
13. SEVER, J.L. - Application of a microtechnique to viral serological investigations - *J. Immunol.* 88: 320-328, 1962.
14. SOUZA, L.T.M. et alii. - Dengue in the State of São Paulo-Epidemiological vigilance. In: III Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, Brasil, 1986. *Resumos*, p.39.
15. SOUZA, L.T.M. - Dengue in Ribeirão Preto: the first autochthonous cases in São Paulo. In: IV Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, Brasil, 1988. *Resumos*, p.41.

Recebido para publicação em 18/04/97

AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA MENINGOCÓCICA EM PACIENTES INTERNADOS EM UM HOSPITAL SENTINELA NO MUNICÍPIO DE CAMPINAS/SP, 1988 - 1991

Brigina KEMP*
Marilyn M. M. ROCHA**
Lygia Busch IVERSSON***

RIALA 6/820

KEMP,B.; ROCHA, M.M.M. & IVERSSON, L.B. - Avaliação do Diagnóstico Laboratorial da Doença Meningocócica em Pacientes Internados em um Hospital Sentinela no Município de Campinas/SP, 1988-1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57 (1): 13-19, 1998.

RESUMO: A análise dos exames realizados em 65 casos de Doença Meningocócica internados no Hospital Álvaro Ribeiro, Campinas/SP, de 1988 a 1991, mostrou que em 56,9% dos casos foi possível identificar os sorogrupos da *Neisseria meningitidis*, onde houve predominância do meningococo sorogrupo B, e em 7,7% foi possível detectar somente o diplococo Gram negativo. Encontrou-se valores de positividade semelhante para bacterioscopia e cultura de líquido céfalorraquidiano (LCR), 61,7% e 61,5% respectivamente. A maior positividade, na associação dos exames, foi encontrada na bacterioscopia e cultura, 74,5%, com valor aproximado na associação de bacterioscopia, cultura e imunoeletroforese cruzada (IEC), 73,8%. Os resultados das associações de bacterioscopia e IEC e de cultura e IEC foram mais baixos e semelhantes: 62,0% e 62,2% respectivamente. Foi baixa a positividade dos exames de IEC, 34,8%.

DESCRITORES: Doença Meningocócica; Diagnóstico Laboratorial; Campinas/SP

INTRODUÇÃO

Na vigilância epidemiológica das meningites é de fundamental importância, a identificação do agente etiológico. Não só a gravidade da doença está relacionada ao agente, como seu comportamento epidemiológico e principalmente sua profilaxia^{9,18}.

Com relação à Doença Meningocócica (D.M.) em especial, os diversos sorogrupos e sorotipos do meningococo, influenciam o tipo de infecção, se assintomática (caracterizando o estado de portador) ou sintomática, com diferenciado padrão em sua incidência, qual seja, endêmica ou epidêmica. Além disso, o conhecimento do tipo do meningococo prevalente em uma situação epidêmica é imprescindível para a adoção de medidas de controle, como a vacinação, uma vez que as vacinas são sorogrupo-específicas^{4,9,18}.

Durante a epidemia de Doença Meningocócica que atingiu o país na década de 70, especialmente a Grande

São Paulo^{11,16}, a campanha de vacinação contra os meningococos sorogrupos A e C realizada em 1975 atuou no decréscimo da doença que só voltou a atingir novamente índices de alerta, na Grande São Paulo, em 1986/1987, e índices epidêmicos em 1988⁴.

Em 1987 a Secretaria de Estado da Saúde, analisando esse aumento dos coeficientes de incidência, identificou que seria necessário uma melhoria da notificação e do diagnóstico etiológico da Doença Meningocócica. Propôs aos serviços de vigilância epidemiológica de alguns municípios que desenvolvessem junto a hospitais selecionados de acordo com a demanda da doença, um trabalho de prática de rotina laboratorial através da realização de bacterioscopia, cultura e imunoeletroforese-cruzada no LCR e/ou sangue de pacientes com diagnóstico clínico de meningite e/ou meningococcemia. Esses hospitais seriam considerados então, como "hospitais sentinela". (CAMARGO, M.C.C: comunicação pessoal, 1987).

* Do Grupo Municipal de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde de Campinas

** Do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Campinas

*** Da Faculdade de Saúde Pública da USP

Em Campinas, naquela ocasião, a Vigilância Epidemiológica Estadual e Municipal e o Instituto Adolfo Lutz Regional (IAL) identificaram como um desses hospitais sentinela o Hospital Álvaro Ribeiro, onde se iniciou uma rotina de diagnóstico laboratorial e de notificação de casos.

A avaliação dessas atividades desenvolvidas de janeiro de 1988 a dezembro de 1991, subsídio importante para o conhecimento epidemiológico da doença e para o funcionamento do Sistema de Vigilância Epidemiológica, é objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudou-se os 65 casos diagnosticados como Doença Meningocócica atendidos pelo Hospital Álvaro Ribeiro no período de 1 de janeiro de 1988 a 31 de dezembro de 1991.

Considerou-se como caso de Doença Meningocócica aquele paciente que obedeceu aos seguintes critérios estabelecidos pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo¹⁰.

- 1) Quadro clínico de meningite apresentando pelo menos um dos seguintes exames laboratoriais positivos em relação ao meningococo: bacterioscopia, cultura e IEC, realizados no LCR e/ou sangue;
- 2) Não apresentar quadro de meningite, mas apresentar quadro febril toxêmico grave com manifestações hemorrágicas, compatíveis com o diagnóstico de meningococemia, apresentando ou não exames laboratoriais positivos para o meningococo;
- 3) Apresentar quadro de meningite associado às manifestações de meningococemia, apresentando ou não exames laboratoriais positivos para o meningococo.

Levantou-se os exames realizados pelo Instituto Adolfo Lutz - Regional Campinas para aqueles pacientes suspeitos de D.M. internados no Hospital Álvaro Ribeiro, utilizando-se as seguintes informações dos relatórios mensais daquele laboratório:

- data de entrada do material no laboratório
- nome do paciente
- idade
- sexo
- município de residência
- exames solicitados
- resultados

Verificou-se se o paciente havia sido notificado, e em caso positivo, acrescentou-se ao registro de cada um, a classificação final da respectiva ficha epidemiológica, de acordo com os critérios de confirmação de caso de D.M. do CVE. Se não houvesse a notificação, procedia-se a investigação daquele paciente, de acordo com a rotina da vigilância epidemiológica, e se fosse necessário, a notificação era feita.

Os parâmetros usados para a avaliação do diagnóstico laboratorial foram os seguintes

- 1- proporção em que foi possível identificar o agente etiológico e por qual método laboratorial;
- 2- proporção de positividade na associação dos métodos realizados: bacterioscopia, cultura e IEC.

Segundo a metodologia recomendada pelo Centro de Referência Nacional de Meningites, Instituto Adolfo Lutz - Ministério da Saúde³, procederam-se os seguintes exames no líquor e sangue dos casos suspeitos de Doença Meningocócica:

1 - Exame bacteriológico de líquor :

- a. Bacterioscopia do esfregaço do sedimento do LCR corado pelo método de Gram modificado por Hucker⁷
- b. Cultura de LCR - semeadura, no momento da colheita, de 4 a 5 gotas de LCR em ágar-chocolate a 5% (sangue de coelho) tendo como meio base o ágar Mueller Hinton. O meio de cultura semeado foi incubado o mais rápido possível a 35-37°C em ambiente de 5-10% de CO₂ e umidade. Havendo crescimento bacteriano, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram modificado por Hucker⁷. A presença de diplococo Gram negativo orientou a identificação pelos métodos usuais para meningococo: provas de oxidase, fermentação de açúcares (dextrose, maltose, lactose, levulose) aglutinação em lâmina com soros aglutinantes anti-meningococo grupo específico.

As bactérias que se apresentaram sob forma de diplococos Gram negativos, com prova de oxidase positiva, utilizando dextrose e maltose e aglutináveis por um dos soros específicos, foram consideradas como *Neisseria meningitidis*.

2 - Hemocultura: sangue colhido na hora da internação em caldo de "Brain Heart Infusion", em uma quantidade de 10 a 20% do volume do meio de cultura, e incubado a 35-37°C. Havendo crescimento bacteriano procedeu-se conforme foi descrito para a cultura de LCR.

3 - Pesquisa de antígenos de meningococo no LCR e soro, por IEC em ceclogel, segundo a técnica descrita por PALHARES & col.¹⁷ com três antissoros correspondentes às *N. meningitidis* dos grupos A, B e C.

Os antissoros aglutinantes e precipitantes para *N. meningitidis* foram preparados no Instituto Adolfo Lutz, Centro de Referência Nacional para Meningites, São Paulo, S.P.

4 - Pesquisa de antígenos de meningococo no LCR e soro, pelo teste de aglutinação pelo látex (LA) pela técnica de

aglutinação em lâmina (segundo as recomendações do fabricante). Os reagentes constituem-se de partículas de látex sensibilizadas por anti-soros específicos que possibilitam a detecção do antígeno correspondente.

Na época deste estudo, o teste de LA não era realizado como rotina pelo Instituto Adolfo Lutz; foi considerado a confirmação de um caso pelo teste de LA feito pelo laboratório do hospital.

RESULTADOS

Identificou-se a etiologia dos casos conforme a seguinte distribuição: 1 caso provocado pelo meningococo sorogrupo A (1.5%), 27 casos pelo sorogrupo B (41%), 8 casos pelo sorogrupo C (12.3%), 1 pelo W135 (1.5%) e 5 casos cuja definição foi somente por bacterioscopia (7.7%). Observou-se um percentual de 35.4% correspondente a 23 casos onde não foi possível identificar o agente etiológico (gráfico 1).

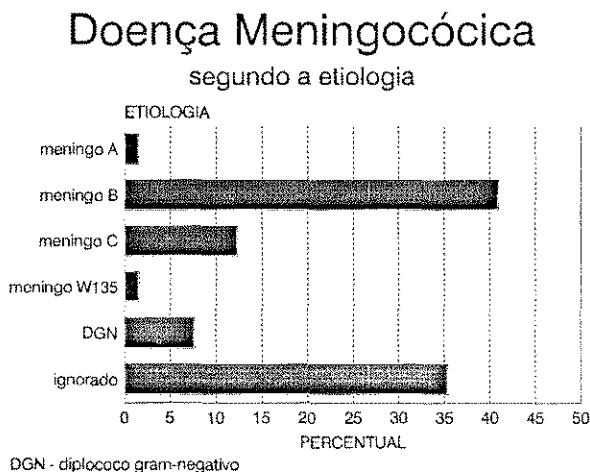


Gráfico 1 - Doença Meningocócica segundo a etiologia.

Fonte : SVE/CAMPINAS - IAL/SES

Para aqueles 23 pacientes onde não foi identificado o agente etiológico, em 18 (78.3%) foi realizado bacterioscopia do LCR, em 19 (82.6%) cultura de LCR, em 20 (86.9%) IEC de LCR e em 4 (17.4%) IEC no soro. Destes 23 doentes, 12 apresentavam meningite com meningococemia e 11 só meningococemia. Para os primeiros, a bacterioscopia de LCR foi feita em 10, a cultura e IEC de LCR em 11 deles, a cultura do sangue em 6 e IEC do soro foi realizada somente em 2 pacientes. Naqueles 11 pacientes com quadro clínico só de meningococemia (sem meningite) em somente 2 foi pesquisado o agente no sangue.

A tabela 1 mostra por qual método diagnóstico identificou-se o sorogrupo do meningococo. Nota-se ser a cultura do líquido o exame que diagnosticou a maioria deles. Embora a IEC do líquido não tenha definido um grande número de casos, ela esclareceu exclusivamente 3, sendo 1 do sorogrupo A e 2 do sorogrupo B. Para estes também foi realizado cultura, porém com resultados negativos. Encontrou-se 1 sorogrupo B em cultura de sangue; este mesmo exame no LCR apresentou-se negativo. Um dos casos devido ao sorogrupo C foi determinado por teste de aglutinação pelo látex no LCR, realizado no laboratório do próprio hospital. Os exames de cultura e IEC feitos no LCR deste paciente foram negativos.

Com relação ao percentual de positividade para cada um dos exames laboratoriais do LCR, é possível verificar na tabela 2, que a bacterioscopia e a cultura apresentaram positividade semelhante com 61.7% e 61.5% respectivamente; o resultado mais baixo foi da IEC com 34.8%. É importante relatar que a positividade da IEC em amostras de LCR nos casos onde a cultura resultou positiva, foi de 37,5% (9 IECs / 24 culturas) para o meningococo B e de 57,1% (4 IECs / 7 culturas) para o meningococo C.

A tabela 3, que expressa a positividade na associação dos métodos laboratoriais do LCR dos pacientes, mostra que o maior resultado foi encontrado com bacterioscopia e cultura de LCR (74.5%). Em seguida observou-se um resultado aproximado, 73.8%, quando se realizou conjuntamente a bacterioscopia, cultura e IEC. Os resultados mais baixos foram apresentados com a realização da bacterioscopia e IEC (62,0%) e a cultura com a IEC (62.2%).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Apesar da importância da identificação do agente etiológico da D.M. conforme já foi referido anteriormente, há dificuldades que independem da atuação do laboratório, seja porque não é coletado material para os exames que seriam necessários, seja porque, quando é colhido, muitas vezes é encaminhado de forma inadequada, dificultando a identificação do agente. Em muitos locais as dificuldades decorrem da falta de recursos para a realização dos exames ou para o encaminhamento do material aos laboratórios de referência.

No caso deste estudo, houve disponibilidade de recursos para a realização dos exames. A sede do laboratório de referência, o IAL Regional, é no próprio município, sendo que o município também conta com serviço municipalizado de vigilância epidemiológica onde atuavam profissionais capacitados e treinados para esta, e outras atividades. Além do que, era no Hospital Álvaro Ribeiro que se desenvolviam as atividades do hospital sentinela, dando-lhe a possibilidade de realização de

TABELA 1

Distribuição numérica e (percentual) de 37 casos de Doença Meningocócica com definição do sorogrupo do meningococo segundo o método diagnóstico que o definiu, Hospital Álvaro Ribeiro, Campinas/SP, período de 1988 a 1991

Exames	Sorogrupo A	Sorogrupo B	Sorogrupo C	Sorogrupo W 135
Liquor cultura	-	24 (88,9%)	7 (87,5%)	1 (100%)
IEC	1 (100%)	2 (7,4%)	-	-
aglutinação pelo latex	-	-	1 (12,5%)	-
SANGUE cultura	-	1 (3,7%)	-	-
IEC	-	-	-	-
TOTAL	1 (100%)	27 (100%)	8 (100%)	1 (100%)

“-”: negativo ou não realizado
Fonte: SVE/Campinas
IAL/SES

TABELA 2

Percentagem de positividade da cada um dos exames laboratoriais realizados no LCR dos pacientes com Doença Meningocócica, Hospital Álvaro Ribeiro, Campinas/SP, período de 1988 a 1991

RESULTADOS	BACTERIOSCOPIA	CULTURA	IEC
POSITIVO	29	32	16
NEGATIVO	18	20	30
TOTAL	47	52	46
POSITIVIDADE (%)	61,7	61,5	34,8

Fonte: SVE/Campinas
IAL/SES

TABELA 3

Percentagem de positividade na associação de exames laboratoriais no LCR de pacientes com Doença Meningocócica, Hospital Álvaro Ribeiro, Campinas/SP, período de 1988 a 1991

EXAMES	NÚMERO	POSITIVIDADE	
		%	TOTAL REALIZADO
BACTERIOSCOPIA + CULTURA	35	74,5	47
BACTERIOSCOPIA + IEC	26	62,0	42
CULTURA + IEC	28	62,2	45
BACTERIOSCOPIA + CULTURA + IEC	31	73,8	42

Fonte: SVE/Campinas
IAL/SES

bacterioscopia, cultura e IEC para qualquer caso suspeito de meningite ou meningococemia que ali viesse a ser internado.

Assim, nos 65 casos de DM internados naquele hospital e que tiveram material encaminhado ao IAL, foi possível identificar o agente etiológico com sorogrupo em 56,9% dos casos e em 7,7% foi possível detectar o diplococo Gram negativo na bacterioscopia, ficando 35,4% dos casos sendo considerados como D.M. apenas pelo critério clínico.

É interessante comentar que não foi somente pela falta de realização de exames que não se verificou a presença da *Neisseria meningitidis*. Para a maioria daqueles casos que permaneceram sem a identificação do agente, foi realizado bacterioscopia e/ou cultura e/ou IEC no LCR, mas em poucos foi feita a hemocultura e IEC no sangue. A análise dos casos deste grupo (sem identificação do agente) e que apresentaram somente meningococemia, mostrou que mesmo sem meningite foi feito a punção do LCR na maior parte deles e em poucos casos foi colhido sangue. Isto mostra um despreparo dos profissionais médicos em relação aos exames a serem realizados, com tendência exagerada para realizar punção líquórica.

Apesar destas críticas, sabemos, em função destes três anos de trabalho acompanhando a ocorrência da Doença Meningocócica em Campinas, que este percentual de casos com identificação do agente etiológico é satisfatório quando comparado com outros serviços. CAMARGO⁵ refere no Município de São Paulo que, no período 1988-1993, em 39% dos casos de DM foi possível identificar o sorogrupo. Em outros países observam-se percentuais maiores de identificação de sorogrupos. Assim, SAMUELSON et al.²⁰ referem na Dinamarca, no período 1980-1988, 79% dos casos notificados com diagnóstico por cultura, 96% dos quais sorogrupados; PINNER et al.¹⁹ referem em seis áreas dos Estados Unidos, em 1986 e parte de 1987, 71% dos casos com informação sobre o sorogrupo; no Canadá²², em 1985, identificou-se o sorogrupo em 60% dos casos e em 1992, em 88%.

A positividade dos exames de líquor analisados separadamente mostrou-se maior na bacterioscopia, com valor bem próximo ao da cultura. A positividade mais baixa foi verificada na IEC.

É importante salientar que, nos casos referidos neste estudo, houve uma predominância do meningococo sorogrupo B (41,5%) seguido do sorogrupo C (12,3%); acompanhando o perfil epidemiológico do Município como um todo, neste mesmo período¹². Podemos relacionar o encontro da menor positividade na IEC com o relato de alguns autores sobre problemas com a sensibilidade da IEC para a detecção do polissacáride do meningococo B, não obtendo sucesso na pesquisa deste antígeno, mesmo quando a cultura é positiva. A detecção da *N. meningitidis* B em fluidos corpóreos tem sido dificultada pela ausência

de um bom anti-soro grupo específico devido a pouca imunogenicidade deste polissacáride bacteriano^{2, 8, 21}. LEVY et al.¹³, para os casos internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, também encontraram menor positividade na IEC de LCR (60,3%) comparada com a positividade da cultura e bacterioscopia (respectivamente 67,9% e 71,6%).

DENIS et al.⁶, estudaram a positividade de métodos laboratoriais para *Neisseria meningitidis* A e C, *Haemophilus influenzae* b e *Streptococcus pneumoniae*, para casos hospitalizados em Dakar, Senegal. O maior percentual de resultados positivos foi na IEC de LCR (90,0%), seguidos da bacterioscopia (80,4%) e cultura (82,0%). No entanto a IEC demonstrou resultados mais satisfatórios para o *H. influenzae* e para o *S. pneumoniae* que para a *N. meningitidis*. Para os dois primeiros agentes os resultados foram respectivamente de 94,5% e 90,1%, para o meningococo foi de 72,5% para o sorogrupo A e 71,2% para o sorogrupo C.

MELLES et al.¹⁵ indicam alguns fatores que podem influir na viabilidade das bactérias interferindo no resultado de cultura, principalmente do meningococo, tais como: volume do líquor semeado, condições de conservação e transporte do material e a ação dos antimicrobianos utilizados pelo paciente antes da punção de LCR. Em função disto, recomendam realização de exames imunológicos complementares no diagnóstico de meningites bacterianas, priorizando o método de IEC.

A interferência dos antibióticos no diagnóstico etiológico das meningites bacterianas foi analisada por MELLES et al.¹⁴. Em 60% das amostras foi identificado o agente etiológico pela bacterioscopia ou por IEC, ficando os demais sem identificação. Os mesmos autores concluíram que a presença de antibióticos no líquor prejudica a identificação do agente etiológico, assim como a concentração destes diminui a positividade dos exames. Por estas dificuldades encontradas, para que se obtenha bons resultados em cultura, assim como para se conseguir diagnósticos mais rápidos das meningites bacterianas é que se têm enfatizado a utilização dos métodos de IEC e látex realizados no LCR, os quais permitem também a identificação do sorogrupo no caso de Doença Meningocócica. No entanto, na fase inicial da doença, antígenos bacterianos podem não estar ainda presentes no LCR, conduzindo a um teste imunológico negativo.

ALKMIN¹, MELLES et al.^{14,15} e LEVY et al.¹³ têm recomendado a utilização de métodos laboratoriais associados para elevar o número de casos com o agente etiológico identificado. Mas, para que se consiga resultados laboratoriais mais específicos do meningococo, com a identificação de seu sorotipo, subtipo, imunotipo e complexo, é fundamental a realização da cultura, permitindo assim maior compreensão da epidemiologia da Doença Meningocócica.

KEMP,B.; ROCHA, M.M.M. & IVERSSON, L.B. - Laboratorial diagnosis evaluation of meningococcal disease in hospitalized patients of a observed hospital in Campinas/SP, Brasil, 1988-1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 13-19, 1998.

ABSTRACT: The analysis in the exams carried out in 65 patients with the meningococcal disease, reported by Alvaro Ribeiro Hospital, Campinas/SP, showed that in 56,9% of the cases it was possible to identify the serogroups of *Neisseria meningitidis* and the predominancy of serogroup B, and 7,7% it was possible to detect diplococcus Gram negative. This study shows that the positivity between bacterioscopy and culture of cerebrospinal fluid (CSF) was similar, 61,7% and 61,5% respectively. The highest positivity in the exam associations, was 74,5% found in bacterioscopy and culture. A similar value, 73,8%, was observed in bacterioscopy, culture and counterimmunoelectrophoresis (CIE). The results of bacterioscopy and CIE association and also culture and CIE were lower, 62,0% and 62,2% respectively. The positivity of the counterimmunoelectrophoresis exam was low, 34,8%.

DESCRIPTORS: Meningococcal Disease, Laboratorial Diagnosis, Campinas/SP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALKMIN, M. G. A.; LANDGRAF, I. M. & MELLES, C. E. A. Avaliação de látex comparativamente à cultura e à imunoelectroforese cruzada no diagnóstico de meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55 (1): 19-24, 1995.
2. ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. Contribuição da imunoelectroforese cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ou soro no diagnóstico de meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1) : 13-17, 1996.
3. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE AÇÕES BÁSICAS DA SAÚDE. DIVISÃO NACIONAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA - Normas Técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas. Brasília. Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1986, 49 (série A: Normas e Manuais Técnicos, 32).
4. CAMARGO, M. C. C. & HIDALGO, N. T. R. Doença Meningocócica: A vacina contra o meningococo B e a situação atual na Grande São Paulo. *Imunizações - Atualização. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Unicef*, 2 (2) : 161-167, 1989.
5. CAMARGO, M. C. C. Doença meningocócica no Município de São Paulo, no período de 1979 a 1993, endemia e epidemia, São Paulo, 1996 [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da USP].
6. DENIS, F.; SALNIER, M.; CHIRON, J.P. Diagnostic étiologique rapide des meningites purulentes par agglutination passive indirecte de particules de latex et par contre-immuno-électrophorèse: expérience et perspectives. *Bull. de l'Organisation mondiale de la Santé*, 59 (1) : 143-151, 1981.
7. FINEGOLD, S.M. & MARTIN, W.J. Diagnostic microbiology, 6th ed. St. Louis, Mosby, 1982, 655-656.
8. GHANASSIA, J.P.; SLIM, A.; BERGNONE-BEREZIN, E. & MODAI, J. Failure of diagnosing group B meningococcal meningitidis 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*. Flórida, CRC Press, 1987, p. 69-99.
10. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Treinamento Básico em Vigilância Epidemiológica, Meningites*, 1986.
11. IVERSSON L. B. Aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no Município de São Paulo (Brasil) no período de 1968 a 1974. *Rev. Saúde públ., S. Paulo*, 10 : 1-16, 1976.
12. KEMP, B. Aspectos epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da Doença Meningocócica no Município de Campinas/SP no período de 1988 a 1993, São Paulo, 1994 [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da USP].
13. LEVY, C.E. et al. Contraimmunoelectroforese e hemaglutinação passiva como métodos complementares para o estudo da infecção meningocócica. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 23 (6) : 256-259, 1981.
14. MELLES, C.E.A.; RAMIRES, M.R.N.; DINIZ, J. M.P.; ADELINO, M.G.F.; TAUNAY, A.E.; ROSSI, C.V. Estudo comparativo de métodos diagnósticos das meningites purulentas. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 20: 202-207, 1978.
15. MELLES, C.E.A.; LANDGRAF, I.M.; FARACO, M.L.; BOSCARDINI, N.B. Valorização da cultura, bacterioscopia e da imunoelectroforese cruzada no diagnóstico das meningites. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49: 61-67, 1989.

16. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE CONTROLE DA MENINGITE - Doença meningocócica(meningite meningocócica e meningococemia). Vigilância Epidemiológica e Controle, 1975.
17. PALHARES,M; GELLI,D.S.; ALMEIDA,M.C.R.; MELLES,C.E.A.; TAKEDA,A.E. & TAUNAY,A.E. Pesquisa de polissacaride de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoelektroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33 : 85-89, 1973.
18. PELTOLA, H. Meningococcal disease : Still with us, *Rev. Infect. Dis.*, 5(1):71-91, 1983.
19. PINNER, R.W. apud CAMARGO, M.C.C. Meningococcal disease in the United States. 1986. *J. Infect. Dis*, 164 : 368-374, 1991. In: Doença meningocócica no município de São Paulo, no período de 1979 a 1993. Endemia e epidemia. São Paulo, 1996. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].
20. SAMUELSSON, S.; GUSTAUSEN, S.; RONNE, I. Epidemiology of meningococcal disease in Denmark 1980-1988. *Scand. J. Infect. Dis.*, 23: 723-730, 1991.
21. 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.
22. WHALEN, C.M.; HOCHIN, J.C.; RYAN, A. & FRASER, A. et al. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada. *JAMA*, 273 (5): 390-394, 1995.

Recebido para publicação em 10/09/97

HEPATITES CRÔNICAS POR VÍRUS - MODELO DE DOENÇA CRÔNICA DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA

Venâncio Avancini Ferreira ALVES*
Raimunda Telma de Macêdo SANTOS*
Alda WAKAMATSU*

RIALA 6/821

ALVES, V. A. F.; SANTOS, R. T. M.; WAKAMATSU, A. - Hepatites Crônicas por vírus - modelo de doença crônica de interesse em saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 21-24, 1998.

RESUMO: HEPATITES CRÔNICAS POR VÍRUS - MODELO DE DOENÇA CRÔNICA DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA

Venâncio Avancini Ferreira Alves ; Raimunda Telma de Macêdo Santos ; Alda Wakamatsu
Laboratório de Imuno-histoquímica - Divisão de Patologia - Instituto Adolfo Lutz

DESCRIPTORIOS: Hepatites virais, Hepatite crônica B, Hepatite crônica C, Imuno-histoquímica, Hibridização "in situ".

ASPECTOS GERAIS

As Hepatites por vírus são doenças de grande importância universal, com significativa prevalência em nosso meio. Recentemente, devido a seu caráter transmissível, com possibilidades de medidas preventivas incluindo ministração de imunoglobulinas ou vacinas, bem como seu potencial de induzir doenças agudas (ocasionalmente graves, como as formas de Necrose Maciça e Submaciça) e de cronificação, o Ministério da Saúde do Brasil tornou compulsória sua notificação aos órgãos de Vigilância Epidemiológica.

Para a definição de medidas sanitárias e terapêuticas impõem-se estudos bioquímicos (no IAL, a cargo da Seção de Análises Clínicas) e sorológicos (no IAL, Laboratório de Hepatites do Serviço de Virologia). Nos casos crônicos, são de grande importância os estudos de replicação viral (no IAL, Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia), bem como as pesquisas morfológicas para diagnóstico e estadiamento da lesão e imuno-histoquímicas para pesquisa de antígenos virais e da resposta do hospedeiro (no IAL, Laboratório de Imuno-histoquímica).

CONCEITUAÇÃO E ETIOLOGIA

O conceito mais aceito para a definição de hepatite crônica é o de conjunto de manifestações clínicas, bio-

químicas, sorológicas e anátomo-patológicas com inflamação hepática não resolvida no prazo de 6 meses ⁽¹⁾.

Numerosas entidades, de causas muito variadas, podem ser incluídas nesta definição, mas há franca tendência entre os hepatologistas em restringir o conceito de Hepatites Crônicas àquelas de origem viral, auto-imune e as relacionadas a ação de drogas, aceitando-se ainda as de causa incerta ^(1,2). Ainda que haja superposição de vários parâmetros entre estas entidades e outras hepatopatias como cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, doença de Wilson e deficiência de alfa-1-antitripsina, os principais autores consideram que estas condições devem ser estudadas separadamente.

Dentre as hepatites crônicas virais, sabe-se que mais de 90% dos casos de hepatite aguda produzida pelo vírus da hepatite B (VHB) evoluem para cura completa enquanto alguns, entretanto, desenvolvem hepatite crônica. Desses, a maioria apresenta a chamada hepatite crônica persistente e apenas 3% dos pacientes com hepatite B desenvolvem hepatite crônica ativa e cirrose ⁽³⁾. A Hepatite D (ou Delta) ocorre como co-infecção ou superinfecção com a Hepatite B, sendo tal associação relacionada a casos agudos de significativa gravidade e também a elevados índices de cronificação ⁽⁴⁾.

Não existem relatos fidedignos que a hepatite A possa evoluir para a cronicidade, o mesmo parecendo válido com relação à hepatite E.

* Laboratório de Imuno-histoquímica - Divisão de Patologia - Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 - 7º andar - CEP 01246-902, São Paulo-Brasil.

Os dados disponíveis sugerem que a hepatite C possa evoluir para a cronicidade em pelo menos 40% dos casos (5,6,7,8). Nota-se, portanto, que embora na maioria dos casos as hepatites virais se comportem benignamente, um número considerável evolua para a cronicidade, o que representa um problema de grande importância clínica e terapêutica com um prognóstico eventualmente reservado. A recentemente identificada Hepatite G parece ter seu significado relacionado a infecção conjunta com o vírus da hepatite C (VHC).

ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A nova classificação histopatológica das hepatites crônicas (1,2,9) surgiu da consciência da necessidade de se oferecer parâmetros mais objetivos, reprodutíveis e com correlação com aspectos clínico-terapêuticos. Para tal, impõe-se analisar separadamente:

1. aspectos ligados ao "estadiamento", significando distúrbios arquiteturais (quanto da arquitetura lobular já foi destruída).
2. alterações de natureza necro-inflamatória, oferecendo uma "gradação da atividade" das lesões em curso, que devem ser sub-compartimentalizadas em Portais, Periportais e Lobulares.

Conforme sugere a nova classificação da IASL (1,2,9), a gradação dos diversos itens deve buscar resposta às situações mais habitualmente vividas em cada ambiente. Para nosso meio, propomos para a semi-quantificação do estadiamento e da gradação da atividade das hepatites crônicas os seguintes critérios:

- I. ESTADIAMENTO: Alteração estrutural
 - zero - nenhum dano à arquitetura lobular
 - 1 - expansão fibrosa de espaços porta
 - 2 - expansão portal com septos porta-porta
 - 3a - septos porta-centro, nódulos ocasionais
 - 3b - nódulos numerosos, com preservação parcial da arquitetura lobular
 - 4 - cirrose

II. ATIVIDADE NECRO-INFLAMATÓRIA ATUAL:

Atividade Portal:

zero a 4, conforme a quantidade de linfócitos e histiócitos portais, devendo ser anotada a presença (ou não) de agregados ou folículos linfóides e a agressão ao epitélio biliar.

Atividade peri-portal:

- zero - ausência de lesões da interface
- 1 - Necrose em sacabocados (NSB) discreta
- 2 - NSB moderada
- 3 - NSB intensa
- 4 - NSB muito intensa

Atividade Lobular:

Semiquantificação das variáveis de lesão lobular, recebendo, em conjunto, uma avaliação em graus de 0

(ausência de lesões) a 4 (muito acentuadas). Devem ser analisadas em separado as necroses de padrão focal e as confluentes.

O laudo anátomo-patológico também deverá incluir os Marcadores Etiológicos, destacando-se, no caso das Hepatites por Vírus, a presença de "Hepatócitos com Citoplasma em Vidro Fosco" como fortemente sugestivo de infecção pelo VHB e o conjunto: Folículos Linfóides Portais, Agressão ao Epitélio de Ductos Biliares e Atividade Necro-inflamatória Lobular com significativo infiltrado mononuclear ao longo de sinusóides como indicativo de infecção pelo VHC (10).

ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A identificação de antígenos em amostras de tecido para biópsia ou necrópsia pode ser obtida por métodos imuno-histoquímicos com diversos sistemas de amplificação, como por exemplo peroxidase-antiperoxidase (PAP) ou avidina-biotina-peroxidase (ABC), aplicáveis inclusive em amostras fixadas rotineiramente em formol tamponado e incluídas em parafina.

No caso das Hepatites Crônicas B, a identificação etiológica pode ser feita de modo específico pela detecção do antígeno de superfície (AgHBs) no citoplasma ou membrana de hepatócitos. Tal antígeno não é habitualmente detectável nas hepatites agudas, exceto nas formas de transição para cronicidade. Nas hepatites crônicas, encontramos inicialmente, com amplificação pelo sistema PAP (11), positividade para este marcador em 98 dentre 139 casos (70%), à semelhança de YOO e cols. (12) com 43 casos positivos em 58 estudados (77%) e URLICH e cols. (13) com 18 em 24 casos (75%). Naquele nosso material, a positividade foi maior nos processos inativos (87,5%), contrastando com os 64% de reatividade nas formas de intensa atividade histológica. Mais recentemente, comprovamos maior sensibilidade no sistema de amplificação ABC, que possibilitou a detecção do AgHBs em todas as 42 amostras de biópsias de hepatite crônica B (14). Não encontramos qualquer correlação da expressão tecidual do AgHBs com evidências de replicação, havendo demonstração da produção deste antígeno mesmo em casos com o genoma viral já integrado ao do hepatócito.

Outro antígeno cuja detecção é de grande utilidade é o antígeno central-core (AgHBc). Sua expressão é preferencialmente nuclear, sendo, juntamente com a detecção de DNA viral por hibridização ou, de forma mais sensível, por reação em cadeia pela polimerase (PCR), marcador fidedigno da replicação viral (15,16). Em nossas casuísticas de 1988 (11) e de 1995 (14), foi elevada a concordância entre positividade tecidual para AgHBc e sorologia positiva para AgHBc. Nas fases mais avançadas da infecção, com integração do genoma

viral ao do hepatócito, deixa de ocorrer a expressão do gene da região "c" (17).

A pesquisa de sequências do genoma viral por Hibridização Molecular "in situ" mostra-se também como um potencial marcador de replicação viral. Até agora, entretanto, esta metodologia apresenta sensibilidade inferior à obtida através da identificação do AgHBc mediante imuno-histoquímica (14).

A pesquisa de marcadores teciduais do VHC em amostras de biópsia fixadas em formol e incluídas em parafina é motivo de grande interesse na literatura mais atual (18). Nossa recente experiência sugere ser a região do core do VHC a fonte mais promissora de antígenos para tal tipo

de estudo, tendo WAKAMATSU (19) detectado positividade em 40 dentre 50 hepatites crônicas C estudadas, com marcação mais significativa em 27 casos (54%). Foi notada uma tendência a relação direta com o grau de atividade periportal e inversa com o grau de lesão lobular.

Em conclusão, o estudo das Hepatites Crônicas Virais, de grande importância em Saúde Pública, tem a morfologia e a imuno-histoquímica como ferramentas fundamentais. No Instituto Adolfo Lutz, tal linha de pesquisa é atualmente direcionada à detecção de marcadores etiológicos e de replicação viral, trazendo contribuição à avaliação prognóstica e ao monitoramento da resposta ao tratamento antiviral.

RIALA 6/821

ALVES, V.A.F. ; SANTOS, R.T.M. ; WAKAMATSU, A. - Viral chronic hepatitis - A model for chronic diseases with major Public Health interest. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 21-24, 1998.

DESCRIPTORS: Viral hepatitis, chronic hepatitis B, Chronic hepatitis C, immunohistochemistry, in situ hybridization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. DESMET, V.J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J.H.; MANNS, M.; SCHEUER, P.J. - Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology*, 19:1513-1520, 1994.
2. ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R.N.M.; PHILLIPS, M.J.; PORTMANN, B.G.; POULSEN, H.; SCHEUER, P.J.; SCHMID, M.; THALER, H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 22:696-699, 1995.
3. REDEKER, A.G. - Viral hepatitis. Clinical aspects. *Amer. J. Med. Sci.*, 270:9-16, 1975.
4. BIANCHI, L & GUDAT, F.: Chronic hepatitis. In: MACSWEEN, R. N. M.; ANTHONY, P. P.; SCHEUER, P. J.; PORTMANN, B.; BURT, A. D., eds. *Pathology of the Liver*, 3rd ed: *Edinburgh, Churchill Livingstone*, 1994; 20:15-20.
5. ALTER, H.J. - The dominant role of non-A, non-B in the pathogenesis of post-transfusion hepatitis: a clinical assessment. *Clin. Gastroent.*, 9:155-170, 1980.
6. BERMAN, M.; ALTER, H.J.; ISHAK, K.G. et al - The chronic sequelae of non-A, non-B hepatitis. *Ann. Intern. Med.*, 91:1-6, 1979.
7. HOPF, U.; MOLLER, B.; KUTHER, D. et al - Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *J. Hepatol.* 10:69, 1990.
8. KNOVELL, R.G.; CONRAD, M.E. & ISHAK, K.G. - Development of chronic liver disease after acute non-A, non-B, post-transfusion hepatitis. Role of gammaglobulin prophylaxis in its prevention. *Gastroenterology*, 72:902-909, 1977.
9. ALVES, V.A.F.; GAYOTTO, L.C.C.: Patologia das Hepatites. Cap.4 in DA SILVA, L.C.: *Hepatites Agudas e Crônicas*, Ed. *Sarvier*, 1995, 2nd Edição.
10. SCHEUER, P.J.; ASHRAFZADEH, P.; SHERLOCK, S.; BROWN, D.; DUSHEIKO, G.M. - The pathology of hepatitis C. *Hepatology*, 15:567-571, 1992.
11. GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F.; VIANNA, M.R.; STRAUSS, E.; CARRILHO, F.J.; SILVA, L.C. - Histopathological, immunohistochemical and serological markers in chronic liver disease due to HBV. *J. Hepatol.* 7 (suppl.1): S 131, 1988.
12. YOO, J.Y.; HOWARD, R.; WAGGONER, J.G. et al - Peroxidase-antiperoxidase detection of hepatitis B surface and core antigen in liver biopsy specimens from patients with chronic type B hepatitis. *J. Med. Virol.*, 23:273-281, 1987.
13. URLICH, T.R.; THEN, L.; GITNICK, G. et al - Chronic active hepatitis of hepatitis B and non-A, non-B etiology. *Am. J. Surg. Pathol.*, 6:33-39, 1982.
14. SANTOS, R.T.M.: Hepatite B - Detecção do genoma viral por hibridização "in situ" e correlação com expressão imuno-histoquímica do AgHBs e AgHBc. *Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP*, 1995.
15. AKIRA, T.; NAKAYAMA, H.; MIYAZAKI, Y. - Relationship between the replication of hepatitis B virus and the localization of virus nucleocapside

- antigen (HBcAg) in hepatocytes. *J. Gen. Virol.*, 68:871-877, 1987.
16. SUSUKI, K.; UCHIDA, T.; SHIKATA, T. - Histopathological analysis of chronic hepatitis B virus (HBV) infection in relation to HBV replication. *Liver*, 7:260-270, 1987.
17. SHAFRITZ, D.A.; SHOUVAL, D.; SHERMAN, H.I. - Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of the cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 305:1067-1073, 1981.
18. GUIDO, M.; THUNG, S.N.: The value of identifying Hepatitis C virus in liver pathology specimens. (Editorial). *Hepatology* 23: 376- 378, 1996.
19. WAKAMATSU, A.: Detecção imuno-histoquímica de antígeno core em comparação com o estadiamento histopatológico. *Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP*, 1996.
- Hepatite C - Análise crítica da detecção de marcadores imuno-histoquímicos em comparação com parâmetros histológicos de gravidade de lesão.

Recebido para publicação em 31/03/97

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE COMPRIMIDOS REVESTIDOS E SOLUÇÕES ORAIS DE SULFATO FERROSO UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA ANEMIA FERROPRIVA.*

Mônica Arcon BATISTIC**
Mariangela Tirico AURICCHIO**
Blanca Elcna Ortega MARKMAN**

RIALA6/822

BATISTIC, M. A.; AURICCHIO, M. T. & MARKMAN, B. E. O. - Avaliação da qualidade de comprimidos revestidos e soluções orais de sulfato ferroso utilizados no tratamento da anemia ferropriva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57 (1): 25-28, 1998.

RESUMO: Foram analisados 41 medicamentos à base de sulfato ferroso apresentados na forma de solução e comprimidos revestidos e encaminhados pelo SUS-SP, como análises fiscais, para controle da qualidade. Das 41 amostras analisadas, 15(37%) não atenderam às especificações de qualidade quanto ao teor de sulfato ferroso e de ácido ascórbico (presente em algumas amostras em associação com o sulfato ferroso), quanto aos aspectos farmacotécnicos e quanto ao rótulo. Em função da importância do uso terapêutico destes medicamentos no combate às anemias ferroprivas, principalmente em crianças, adolescentes e mulheres em idade fértil, é fundamental que se estabeleçam programas de monitoramento de controle de qualidade para garantir a eficácia dos mesmos.

DESCRITORES: anemia ferropriva; sulfato ferroso; solução oral; comprimido revestido; controle de qualidade.

INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro, ou ferropriva, é uma das causas mais frequentes encontradas nas consultas clínicas e talvez seja um dos problemas de saúde mais significativos em todo mundo, como demonstrado em vários encontros internacionais sobre nutrição.^{12,13,14,16} Esta anemia é caracterizada pela diminuição da síntese de hemoglobina como consequência da falta de ferro no organismo. Algumas raras doenças que alteram o metabolismo do ferro e outras mais comuns, como a giardíase, podem ser responsáveis pela má absorção de ferro, levando à anemia principalmente em crianças.^{6,19} A prevalência em populações de alto risco, como crianças, adolescentes e mulheres em idade fértil, situa-se por volta de 50% nos países em desenvolvimento e em 10% em países com programas de prevenção estabelecidos.¹⁰ Em estudos realizados em centros de saúde do município de São Paulo, em gestantes de primeira consulta e em adolescentes grávidas, constatou-se uma prevalência de 12,4%

e 14,3%, respectivamente.^{8,9} No Estado de São Paulo, a Secretaria Estadual da Saúde, em 1990, aprova a "Norma Técnica de Anemia Ferropriva para Gestante", a qual preconiza prescrição e fornecimento de suplementação medicamentosa de ferro a todas as gestantes à partir da primeira consulta, no puerpério e período de lactação (um comprimido de 200 mg de sulfato ferroso por dia, equivalente a 40 mg de ferro elementar).² Sendo que a anemia ferropriva obedece sempre a um desequilíbrio entre absorção, perda e consumo de ferro pelo organismo, o tratamento através da administração oral de ferro, na forma de sais, encontra bons resultados. A biodisponibilidade destes sais, como os sulfatos ferrosos e férrico, é bastante variável dependendo da forma farmacêutica, do estado de oxidação e da solubilidade do ferro na presença de substâncias quelantes ou oxidantes na dieta. Frente ao pH ácido do estômago, os dois tipos são solúveis; à medida que aumenta o pH no duodeno, o sal férrico tende a formar hidróxidos férricos insolúveis. A adição de agentes oxidantes, como o ácido ascórbico, garante que o ferro

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

esteja na sua forma reduzida, ainda solúvel em pH neutro.^{5,18} As formas farmacêuticas mais utilizadas, devido ao baixo custo e facilidade de administração, são os comprimidos revestidos e as soluções orais de sulfato ferroso que revelaram boa biodisponibilidade de ferro, assim como a associação destes com o ácido ascórbico. No Brasil, estes medicamentos fazem parte da lista de medicamentos essenciais do Ministério da Saúde e são distribuídos pela rede básica através das Secretarias de Saúde, dos municípios e do Estado, no âmbito da atenção primária e, mais recentemente, no programa DST/AIDS.¹¹

A Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz realiza o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo sulfato ferroso, provenientes do SUS, e de associações de sulfato ferroso e ácido ascórbico, provenientes de análises de orientação. Verificou-se que, em alguns casos, as soluções já se apresentavam com precipitados e com a coloração alterada e os comprimidos com rachaduras, estufados e alterados na coloração. Com o objetivo de se verificar a qualidade destes medicamentos, já que os mesmos são utilizados como suplemento de ferro aos anêmicos e fornecidos na rede pública, foi feito um levantamento dos resultados obtidos nas análises realizadas em comprimidos revestidos e soluções orais de sulfato ferroso, no período de 1993 a junho de 1997, considerando-se o teor em sulfato ferroso e ácido ascórbico e aspectos farmacotécnicos, como a presença de precipitados e coloração no caso das soluções, assim como rachaduras e/ou estufamentos, coloração e peso-médio no caso dos comprimidos revestidos. A análise do rótulo foi realizada baseada no Decreto-Lei nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977, que disciplina o registro, a comercialização e a fiscalização de medicamentos.³

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram analisadas 41 amostras de comprimidos revestidos e soluções orais de sulfato ferroso, de 19 laboratórios farmacêuticos diferentes, provenientes de análises fiscais e de orientação, recebidas pela Seção de Farmacognosia, no período de 1993 a junho de 1997.

MÉTODOS

A determinação do teor de sulfato ferroso destas preparações, nas formas de soluções orais e comprimidos revestidos, foi realizada segundo técnica titulométrica com sulfato cérico, descrita na Farmacopéia Brasileira 3ª Edição.⁷

A verificação da presença de precipitados e alteração da coloração foi realizada em todas as soluções recebidas. Para os comprimidos revestidos foram determinados os pesos médios e a verificação da integridade dos mesmos para a caracterização do aspecto.

RESULTADOS

Das 41 amostras analisadas, 15(37%) não se encontravam de acordo com as especificações de qualidade (Tabela 1); destas, sete não atenderam às exigências quanto ao teor do princípio ativo presente na formulação, sendo que três amostras estavam em desacordo quanto ao teor de sulfato ferroso e as outras quatro amostras em desacordo quanto ao teor de ácido ascórbico (quando este estava presente nas associações com sulfato ferroso). Quanto ao aspecto farmacotécnico, quatro amostras apresentaram alterações (presença de precipitados em soluções, estufamentos e/ou rachaduras e variação de peso-médio em comprimidos), e outras quatro amostras estavam em desacordo quanto ao rótulo (prazo de validade vencido) (Figura 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que 37% das amostras analisadas não atenderam às especificações de qualidade. Os problemas assinalados ocorreram com relação ao teor de sulfato ferroso, tanto acima quanto abaixo do declarado na fórmula, com o teor de ácido ascórbico, sempre abaixo do valor declarado e com os aspectos farmacotécnicos, onde foram constatados precipitados, no caso das soluções, e rachaduras e/ou estufamentos nos comprimidos revestidos. Esta última observação indica, provavelmente, uma umidade excessiva devido ao acondicionamento inadequado propiciado pelos blisteres de pa-

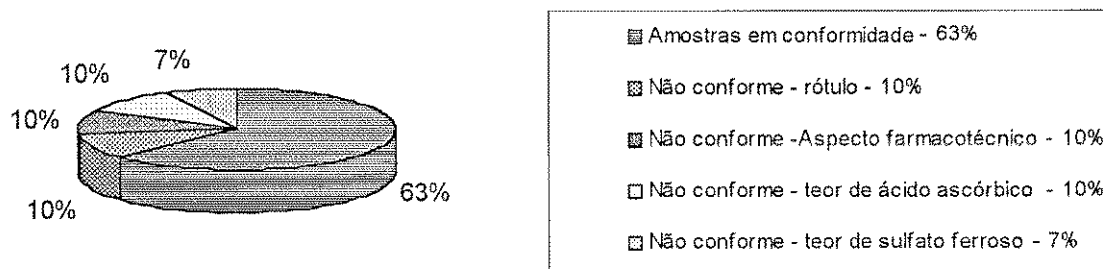
TABELA 1

Distribuição dos resultados das análises em amostras de sulfato ferroso, por ano, Seção de Farmacognosia, Instituto Adolfo Lutz, 1993 a junho 1997.

Ano	1993	1994	1995	1996	1997 (até junho)	Total	%
Resultados							
Aprovados	10	6	6	2	2	26	63
Reprovados	4	3	6	2	-	15	37
Total	14	9	12	4	2	41	100

FIGURA 1

Distribuição dos resultados das análises de sulfato ferroso não conformes com as especificações, segundo causa da não conformidade. Seção de Farmacognosia, Instituto Adolfo Lutz, 1993 a junho de 1997.



pel; esta alteração não foi observada em comprimidos acondicionados em frascos de vidro escuro. Tal constatação sugere a observância de cuidados na escolha da embalagem deste tipo de forma farmacêutica por parte do fabricante e de locais apropriados, com temperatura e umidade controlados, para estocagem nos centros de distribuição. No caso das soluções que apresentaram precipitados, pode-se concluir que a estabilidade da solução não estava satisfatória, talvez em relação à manutenção do pH, propiciando a precipitação do sal ferroso. É fundamental que a concentração do sulfato ferroso esteja, em ambas as formas farmacêuticas, de acordo com o preconizado para assegurar níveis séricos de ferro adequados ao restabelecimento da concentração normal de hemoglobina. Em relação ao ácido ascórbico, todas as preparações apresentaram teor abaixo do declarado no rótulo; este fato era previsível, já que sua função na formulação não é terapêutica, mas garantir a manutenção do estado de oxidação do ferro na sua forma reduzida (Fe^{2+}), melhorando a absorção do ferro no trato gastrointestinal. Portanto, esta preparações contendo ácido ascórbico não podem ser consideradas como associações de dois princípios ativos; o ácido ascórbico só estaria presente como um coadjuvante e não poderia constar do rótulo, como substância ativa, aumentando o custo do medicamento e induzindo o consumidor a adquirir um produto que, na realidade, não contém a quantidade de ácido ascórbico declarado.

Um outro aspecto importante a ser considerado seria a busca da melhoria da biodisponibilidade das preparações,

visando uma possível diminuição da dose a ser administrada e, conseqüentemente, minimizando a maioria dos efeitos colaterais provocados pelos sais de ferro.^{4,15,16} Isto promoveria uma melhor adesão a este tipo de tratamento por parte dos pacientes, já que estes não sofreriam desconfortos como náuseas, constipações e outros efeitos relatados, e poderiam continuar o tratamento por no mínimo dois meses a partir do restabelecimento do nível de hemoglobina como recomendado, contribuindo para a diminuição da taxa de anemia ferropriva, meta a ser alcançada pela OMS até o ano 2000.^{1,17}

Cabe assinalarmos que os resultados obtidos referem-se a demanda espontânea e aleatória proveniente do SUS, alertando o laboratório de saúde pública da importância de se realizar um estudo monitorado destas preparações farmacêuticas, juntamente com a Vigilância Sanitária, contribuindo para assegurar a eficácia dos programas direcionados aos grupos com prevalência da anemia ferropriva.

Seria importante que os medicamentos distribuídos para os programas já estabelecidos pelas secretarias de saúde, que visam a suplementação medicamentosa de ferro, pudessem ser acompanhados laboratorialmente para assegurar a qualidade dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos colegas da Seção de Química Biológica pela realização das análises de ácido ascórbico.

RIALA6/822

BATISTIC, M. A ; AURICCHIO, M. T. & MARKMAN, B.E.O - Quality control of ferrous sulphate tablets and oral solutions used on the iron-deficiency anaemia. *Rev. Inst. AdolfoLutz*, 57 (1): 25-28, 1998.

ABSTRACT: In order to control the quality of some pharmaceutical preparations containing ferrous sulphate useful to prevent iron-deficiency in infants, children and young women, 41 samples were analysed. Those samples were presented in two dosage forms, such as oral solutions and tablets.

The test results showed that 15(37%) samples didn't meet the requirements of the official monographies anyway. From those not compliant samples, seven didn't meet the requirement for the stated concentration of ferrous sulphate and/or ascorbic acid, four didn't meet the requirements for stability and four didn't meet the requirements for label. Problems with precipitations in the liquids dosage forms and crackings in the tablets are discussed. Quality control programs have to be established to monitorate the drugs listed as essential drugs in Brasil.

DESCRIPTORS: iron-deficiency anaemia; ferrous sulphate; oral solution; tablets; quality control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENTLEY, D. P. & JACOBS, A.- Accumulation of storage iron in patients treated for iron-deficiency anaemia- *Brit. Med. J.*, 2: 64-66, 1975.
2. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. - Resolução S S- 131, de 16 de maio de 1990, da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. *Diário Oficial*, São Paulo, 18 de maio de 1990, p. 13. Aprova a Norma Técnica de Anemia Ferropriva para gestantes atendidas na rede de serviços de saúde do SUS-SP.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete ao sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros.
4. CECIL- Tratado de medicina interna- Editores: James B. Wyngarden, Lloyd H. Smith Jr. 18 ed., vol. 1 e 2, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
5. COOK, J. D.; CARRIAGA, M.; KAHN, S. G.; SCHALCH, W. & SKIKNE, B.S.- Gastric delivery system for iron supplementation. *Lancet*, 335: 1136-9, 1990.
6. DE VIZIA, B.; POGGI, V.; VAJRO, P.; CUCCHIARA, S. & ACANTORA, A.- Iron malabsorption in giardiasis. *J. Pediatr.*, 107(1):75-78, 1985.
7. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3 ed., Organização Andrei Edit., 1977, p. 746-48.
8. FUJIMORI, E.- Gravidez na adolescência: estado nutricional referente ao ferro. SP, 1994. 99 p. (Tese de doutorado- Faculdade de Saúde Pública- USP)
9. GUERRA, E. M.- Prevalência de anemia em gestantes de primeira consulta em centros de Saúde do Estado no Subdistrito de Paz do Butantã, Município de São Paulo. SP, 1989. 99 p. (Tese de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP).
10. HARTMAN, K. R.; BARKER, J. A.- Microcytic anemia with iron malabsorption: an inherited disorder of iron metabolism. *Am. J. Hematol.*, 51: 269-75, 1996.
11. HILGARTNER, M.- Hematologic manifestations in HIV-infected children. *J. Pediatr.*, 119(1): S47-49, 1991.
12. IDJRADINATA, P. & POLLITT, E.- Reversal of development delays in iron-deficient anaemic infants treated with iron. *Lancet*, 341: 1-4, 1993.
13. LOZOFF, B.; BRITTENHAM, G. M.; WOLF, A. W.; McCLISH, D. K.; KUHNERT, P. M.; JIMENEZ, E.; JIMENEZ, R.; MORA, L. A.; GOMES, I. & KRAUSKOPH, D.- Iron deficiency anemia and iron therapy effects on infant developmental test performance. *J. Pediatrics*, 79: 981-95, 1987.
14. RAPAPORT, S. I.- Hematologia. 2 ed., Roca, 1990.
15. REEVES, J. D. & YIP, R.- Lack of adverse side effects of oral ferrous sulfate therapy in 1-year-old infants. *J. Pediatrics*, 75(2): 352-55, 1985.
16. SANS-SABRAFEN, J.- Hematologia Clínica. Barcelona, Ed. Doyma, 1988. P. 177-93.
17. SUHARNO, D.; WEST, C. E.; MUHILAL; KARYADI, D. & HAUTVAST, J. G. A. J.- Supplementation with vitamin A and iron nutritional anaemia in pregnant women in West Java, Indonesia. *Lancet*, 342: 1325-28, 1993.
18. WALKER, S. E.; PATON, T. W.; COWAN, D. H.; MANUEL, M. A. & DRANITSARIS, G.- Bioavailability of iron in oral ferrous sulfate preparations in healthy volunteers. *Can. Med. Assoc. J.*, 141: 543-7, 1989.

Recebido para publicação em 18/08/97

DESINFECÇÃO DE ÁGUA COM RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA: EFICIÊNCIA BACTERICIDA

Marco Roberto PIRES**
Beatriz PISANI***
Maria Ângela Garnica PRANDI***
Marise SIMÕES***

RIALA 6/823

PIRES, M. R.; PISANI, B.; PRANDI, M. A. G.; SIMÕES, M. - Desinfecção de água com radiação ultravioleta: eficiência bactericida. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(1): 29-34, 1998.

RESUMO: A desinfecção de água com radiação ultravioleta tem demonstrado ser uma alternativa à cloração. O objetivo deste trabalho é estudar a inativação dos microrganismos. Utilizou-se um reator (câmara de desinfecção) equipado com lâmpada de ultravioleta, operando no sistema de batelada. Os microrganismos inativados foram *E.coli*, *P.aeruginosa*, *A.hydrophila*, *E.faecalis* e *V.cholerae*. A *E.coli* se mostrou o microrganismo de maior resistência inicial, mas a de maior constante de inativação; o *E.faecalis* foi o mais resistente.

DESCRITORES: desinfecção; radiação ultravioleta; inativação de microrganismo.

INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (uv) tem demonstrado ser eficiente na inativação de microrganismos e uma alternativa à cloração. Este tipo de desinfecção é conhecido desde o início do século, mas por problemas de confiabilidade do equipamento, tecnologia, entre outros foi abandonado. Nos últimos anos, este sistema tem se tornado popular, principalmente nos países europeus.

Para a obtenção da radiação uv, são utilizadas lâmpadas especiais (semelhantes às lâmpadas fluorescentes) de baixa-pressão. Os raios de uv pertencem ao espectro eletromagnético, entre a luz visível e os raios-X. Estas lâmpadas emitem raios no comprimento de onda de 253,7 nm, que é o comprimento de maior efeito bactericida (Sobotka, 1993).

A dose de radiação uv é dada pelo produto da intensidade de energia e tempo de exposição, como mostra a equação (1) (Qualls et al., 1983):

$$D = I.t \quad (1)$$

onde:

D: dose de radiação ultravioleta (W.s/cm²);
I: intensidade de radiação germicida (W/cm²); e,
t: tempo de exposição (s).

A fração de sobrevivência (N/N₀) dos microrganismos é uma função direta da dose aplicada:

$$N/N_0 = f(\text{dose}) \quad (2)$$

onde N₀ e N são, respectivamente, a densidade de microrganismos antes e depois da radiação ultravioleta. As equações (1) e (2) sugerem que a intensidade e o tempo de exposição podem ser variados reciprocamente para se obter a mesma fração de sobrevivência (Qualls e Johnson, 1985).

A radiação quando penetra no meio líquido é absorvida por substâncias presentes na água, como matérias orgânicas e dissolvidas, partícula em suspensão, e pela própria água (Sobotka, 1993). Esta absorção segue a lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0.e^{-\alpha.x} \quad (3)$$

onde:

* Doutorando em Saneamento pela Faculdade Engenharia Civil da UNICAMP

** Realizado no Instituto Adolfo Lutz – Regional Campinas-SP

I: Intensidade de radiação no meio líquido (W/cm^2);
 I_0 : Intensidade de radiação na fonte (W/cm^2);
 x: espessura da camada líquida (cm); e,
 α : coeficiente de absorção ou absorvância (cm)⁻¹.

Considerando que na superfície líquida $x=0$, a intensidade de radiação é máxima ($I=I_0$), desprezando a absorção pelo ar entre a fonte de radiação e a superfície líquida, e que a intensidade é mínima na profundidade x, pode-se calcular a intensidade média (I_m) integrando a equação (3), resultando em:

$$I_m = \frac{\int_0^x I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot x} \cdot dx}{x} \quad (4)$$

Desta forma, a intensidade média resultante é:

$$I_m = \frac{I_0}{\alpha \cdot x} (1 - e^{-\alpha \cdot x}) \quad (5)$$

Os microrganismos atingidos pela radiação uv sofrem alterações no DNA ou RNA, inativando-os. Esta inativação se deve aos dímeros de pirimidina formados entre moléculas adjacentes de pirimidina do mesmo elemento de DNA, podendo interromper tanto a transcrição como a replicação (Lindenauer e Darby, 1994). A inativação é dada pela função exponencial em relação à dose (Severin, 1980):

$$\ln \frac{N}{N_0} = -k \cdot I \cdot t \quad (6)$$

onde:

N: microrganismos sobreviventes (UFC/ml);

N_0 : microrganismos iniciais (UFC/ml);

k: taxa constante de inativação ($W \cdot s/cm^2$)⁻¹;

I: intensidade de energia germicida (W/cm^2); e,

t: tempo de exposição (s).

A equação (6) é uma expressão teórica padrão (Daniel, 1993), baseada em observações empíricas (Severin, 1980). Esta equação tem como hipóteses básicas:

- a intensidade da radiação é constante através da camada líquida;
- a absorção pelo meio líquido é desprezível;
- a inativação é função da dosagem de ultravioleta (Severin, 1980; Harm, 1980);
- uma única lesão é suficiente para inativar o microrganismo (Harm, 1980); e,
- a população de microrganismos tem sensibilidade homogênea quanto à radiação uv.

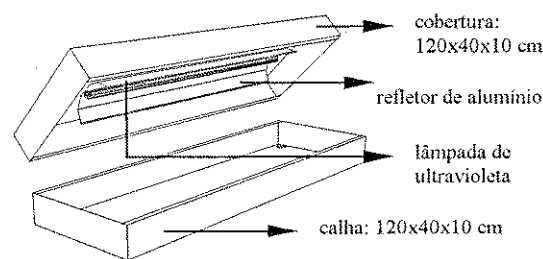
Como foi visto anteriormente, ocorre a absorção pelo meio líquido, e a intensidade da radiação não é homogênea nas camadas líquidas. Assim, pode-se fazer uma correção na equação (6), unindo-a com a equação (5):

$$\ln \frac{N}{N_0} = -\frac{k \cdot I_0 \cdot t}{\alpha \cdot x} (1 - e^{-\alpha \cdot x}) \quad (7)$$

As câmaras de desinfecção com radiação uv são conhecidos como reatores fotoquímicos. Há vários tipos de reatores fotoquímicos como os de lâmpadas emersas, cilíndricos de câmaras luminosas coaxiais e tipo radial (Braun et al., 1986).

METODOLOGIA

Reator Fotoquímico: o reator utilizado foi o do tipo



de lâmpada emersa, construído em alumínio polido. A figura 1 apresenta o reator e suas dimensões.

FIGURA 1 - Esquema do reator de ultravioleta

A parte inferior é chamada de calha onde é colocada a água a ser desinfetada. Separadamente, foi construído um reservatório auxiliar onde são realizadas as medições de cloro residual, inativação do mesmo e posterior contaminação com os microrganismos.

Lâmpada: foi utilizada uma lâmpada de ultravioleta de baixa-pressão de vapor de mercúrio (marca General Electric) de potência nominal de 30 W.

Cloro Residual: para medir o cloro residual utilizou-se o método da orthotolidina, através de um medidor de "Hellige", equipado com disco colorido.

Absorvância: medida com um espectrofômetro marca Micronal B382, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, e comprimento óptico de 254 nm.

Intensidade de Radiação Ultravioleta: utilizou-se um radiômetro marca Cole-Parmer Instrument Company modelo 9811 de comprimento de onda de 254 nm.

Dose de radiação ultravioleta: foi determinada através da equação (1), sendo a intensidade considerada como apresentada na equação (5).

Parâmetros Biológicos: para avaliação da qualidade microbiológica da água, uma alternativa foi a pesquisa de organismos indicadores de contaminação fecal. Como indicadores de contaminação fecal foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 7080). Foram utilizados também outros microrganismos, como:

Aeromonas hydrophila (IAL - 1961): que tem sido isolada de amostras de águas cloradas e de fezes de animais. É um patógeno importante, principalmente, para os indivíduos imunodeprimidos;

Vibrio cholerae (569-B não toxigênico - IAL 1954): este organismo é excretado em grande número de pacientes com cólera e convalescentes. A doença é transmitida primariamente pela rota fecal-oral, embora indiretamente por águas de abastecimento;

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 14502): amplamente distribuídas na natureza. São patógenos humanos oportunistas, geralmente restritos a pacientes hospitalizados. Sobrevive por vários meses em água a temperatura ambiente, multiplica-se em fluidos e ambientes úmidos.

Realizou-se para cada microrganismo eleito, cepas biofilizadas adquiridas na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, uma suspensão em Brain Heart Infusion (BHI) Broth. Foram feitas diluições seriadas de 10^6 a 10^{12} em caldo BHI, exceto para o *V. cloacae* que foi utilizado água peptonada alcalina e semeaduras em meios seletivos e diferenciais, pelo método de superfície e em meio para contagem padrão, a fim de quantificar a carga microbiana inoculada na reservatório auxiliar. Para as contagens padrão em placas utilizou-se o meio Plate Count Agar e a metodologia recomendada pelo "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater". Para identificação e quantificação da *E. coli* foi utilizado o meio Mc Conkey Agar, para o *E. faecalis* o meio Agar Sangue, para a *A. hydrophila* o meio Aeromonas Medium (Bile-salt-Irgasan-Brilliant Green - Agar), para o *V. cholerae* o meio TCBS (Thiosulfate Bile-salt Sucrose Agar) e para a *P. aeruginosa* o meio Cetrimide Agar. Nas amostras coletadas antes e após a incidência da luz a metodologia utilizada foi a mesma descrita para quantificar a carga microbiana.

Operação do Sistema: o reator operou no sistema de batelada (fluxo intermitente), utilizando água do serviço de abastecimento público de Campinas - SANASA. Devido a utilização desta água, houve a necessidade de inativar o cloro residual combinado com tiosulfato de sódio (solução a 3%) na proporção de 0,1 ml para cada 100 ml, suficiente para neutralizar até 5 mg/l de cloro. Após a inativação, a água foi contaminada com o microrganismo em estudo, e coletada uma amostra para obter a concentração inicial (UFC/ml). Estas primeiras amostras foram coletadas do reservatório auxiliar. A água contaminada foi colocada no reator até a altura da lâmina d'água de 4 cm (volume de 19,2 litros). Então, o sistema foi fechado, operando por 90 segundos, coletando-se amostras a cada 15 segundos. O esquema de amostragem pode ser visto na tabela 1.

Os resultados foram analisados segundo a equação (7), com o objetivo de obter a constante de inativação ultravioleta (k) para cada microrganismo, bem como verificar a eficiência de inativação.

TABELA 1 - Esquema de amostragem

Amostra	Local	Tipo	Tempo
1	Reservatório	verificação do cloro residual	-
2	Reservatório	inativação do cloro residual	-
3	Reservatório	isenção de contaminação	-
4	Reservatório	número inicial de microrg.	-
5	sistema UV	Irradiada	15 s
6	sistema UV	Irradiada	30 s
7	sistema UV	Irradiada	45 s
8	sistema UV	Irradiada	60 s
9	sistema UV	Irradiada	75 s
10	sistema UV	Irradiada	90 s

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A absorvância medida foi de $0,085 \text{ cm}^{-1}$, utilizando a água destilada como solução branco. A intensidade de radiação ultravioleta foi de $0,095 \text{ nW/cm}^2$. Então a intensidade média (equação 5) foi de $80,5 \text{ } \mu\text{Ws/cm}^2$. A dose de radiação ultravioleta (equação 1) para cada tempo de coleta, pode ser observada na tabela 2.

O tempo de exposição de 90 s foi suficiente para inativação de 100% dos microrganismos, exceto o *Enterococcus faecalis* que sofreu uma inativação de 99,99%. Ainda, este tempo de exposição é sempre inferior aos outros desinfetantes. Os resultados experimentais são apresentados na tabela 3. Inicialmente, a *Escherichia coli* e a *Aeromonas hydrophila* foram os microrganismos mais resistentes, e o *Vibrio cholerae* e a *Pseudomonas aeruginosa* foram os menos resistentes. A figura 2 mostra a relação entre a taxa de sobrevivência (N/N_0) em função da dose de radiação ultravioleta aplicada para cada microrganismo.

Com base nos resultados, os dados experimentais foram analisados segundo a cinética de inativação representada pela equação (7), com o objetivo de estimar o valor da constante de inativação (k) com radiação ultravioleta. Os valores das constantes estão apresentadas na tabela 4.

Como pode ser observado pela tabela 4, para todos os microrganismos o coeficiente de correlação (r) foi sempre superior a 0,932. O valor da constante de inativação com ultravioleta (k) varia para cada microrganismo. Esta constante representa a taxa com que ocorre a inativação.

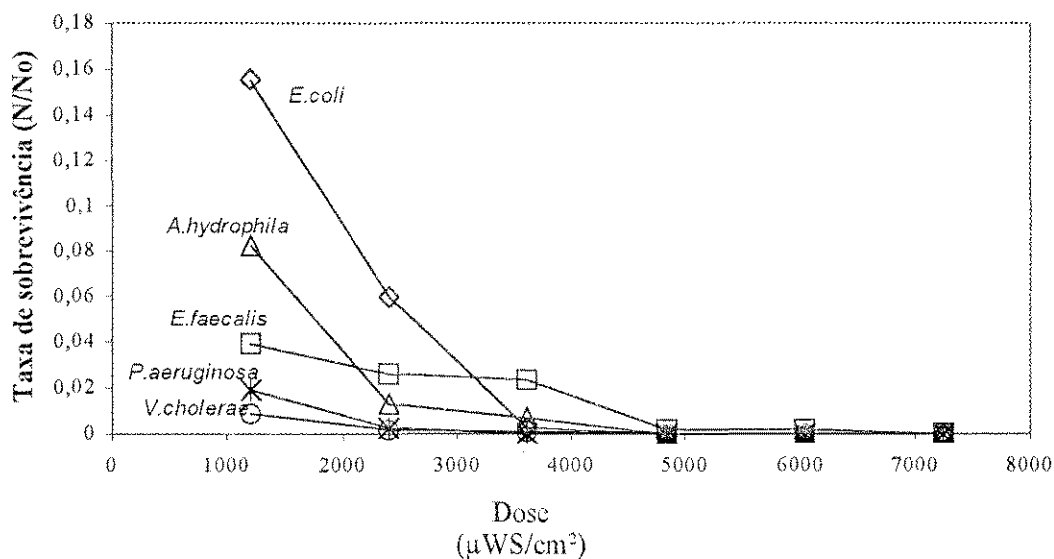
TABELA 2 - Dose de radiação ultravioleta

Tempo (s)	Dose ($\mu\text{Ws/cm}^2$)
15	1207,50
30	2415
45	3622,50
60	4830
75	6037,50
90	7245

TABELA 3 – Resultados Experimentais: relação entre a taxa de sobrevivência (N/N_0) em função da dose de radiação ultravioleta aplicada para cada microorganismo

Parâmetros	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	
Concentração Inicial (N_0 – UFC/ml)	$2,0 \times 10^6$	$9,30 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$	$7,60 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5$	
Fração de sobrevivência (N/N_0)	15 s	0,1555	0,00839	0,0823	0,03947	0,0191
	30 s	0,06	0,00183	0,0129	0,02632	0,0027
	45 s	0,00275	0,00094	0,0071	0,02368	0
	60 s	0,0003	0,00029	0	0,00184	-
	75 s	0	0,00003	-	0,00132	-
	90 s	-	0	-	0,00002	-
Porcentagem de Desinfecção (%)	15 s	84,45	99,16	91,76	96,05	98,09
	30 s	94,00	99,82	98,70	97,37	99,73
	45 s	99,73	99,90	99,29	97,32	100
	60 s	99,97	99,97	100	99,81	-
	75 s	100	99,99	-	99,87	-
	90 s	-	100	-	99,99	-

FIGURA 2 – Taxa de sobrevivência em função da dose de radiação ultravioleta para cada microorganismo



A relação que se estabelece para a constante k entre os microorganismos analisados é dada por:

$$k_{E.coli} > k_{A.hydrophila} > k_{V.cholerae} > k_{P.aeruginosa} > k_{E.faecalis}$$

Esta relação da taxa de inativação é importante para estabelecer critérios para escolha do melhor indicador de contaminação, quando se trabalha com radiação ultravioleta. Então, para a mesma quantidade inicial de microorganismo, a *E. coli* é o primeiro microorganismo a ser inativado, e o *E. faecalis*, o último. Porém, a resistência ao desinfetante é apenas um dos requisitos necessário para um microorganismo ser considerado um indicador de contaminação fecal, outros requisitos como estar presente sempre em maior quantidade que os patógenos, análise

laboratorial rápida, não se reproduzir fora do intestino, e facilidade de detectar e quantificar devem ser levados em consideração. Desta forma, um bom indicador de contaminação seria a *Escherichia coli* conjuntamente com o *Enterococcus faecalis*.

A determinação da dose de radiação ultravioleta é um dos principais fatores da confiabilidade do sistema. Não há ainda no Brasil, uma regulamentação oficial indicando qual deve ser a dose mínima exigida para inativação satisfatória, isto é, dentro dos padrões de potabilidade. A US Publ Health Service (Tobin et al., 1983) recomenda que a dose mínima deve ser de 16.000 µWs/cm² em todo reator de desinfecção. Esta dose é suficiente para inativar a maioria dos microorganismos patogênicos, principalmente bactérias. A dose para inativação de 100% de *E. coli* é

TABELA 4 – Valor da constante de inativação (k) com radiação ultravioleta para cada microorganismo

Microrganismo	Constante de Inativação k ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$) ¹	Coefficiente de Correlação (r)
<i>E.coli</i>	$2,50 \times 10^{-3}$	-0,942
<i>P.aeruginosa</i>	$1,74 \times 10^{-3}$	-0,971
<i>A.hydrophila</i>	$2,20 \times 10^{-3}$	-0,932
<i>E.faecalis</i>	$1,23 \times 10^{-3}$	-0,950
<i>V.cholerae</i>	$2,07 \times 10^{-3}$	-0,979

de $6.600 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$, e para *P.aeruginosa* é de $10.500 \text{ mWs}/\text{cm}^2$ (Tobin et al., 1983). Os valores encontrados neste trabalho foram de $5.750 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ para *E.coli*, e $7.245 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ para a *P.aeruginosa*. Esta comparação limita-se aos valores numéricos, ou seja, não está se comparando valores com o mesmo método para determinação da dose. No caso de uma padronização para calcular a dose, a comparação poderia ser completa.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados experimentais obtidos, pode-se concluir pontos importantes com relação ao sistema de

desinfecção com radiação ultravioleta, como:

- a inativação dos microrganismos ocorre em um tempo de exposição (ou contato) menor quando comparado com outros desinfetantes utilizados;
- a dose de radiação ultravioleta para inativação de 100% de *E.coli* ($5750 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$) e *P.aeruginosa* ($7245 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$) são compatíveis aos encontrados na literatura;
- o coeficiente de correlação foi sempre superior a 0,932, demonstrando que a inativação dos microrganismos comporta-se de acordo com a cinética (eq. 7) proposta;
- a *E.coli* foi o microrganismo de maior resistência inicial, seguida da *A.hydrophila*. Enquanto que o *V.cholerae* e a *P.aeruginosa* foram os menos resistentes, inicialmente;
- o *E.faecalis* foi o microrganismo mais resistente à radiação ultravioleta, sendo que após 90 s não foi completamente inativado. A dose de ultravioleta estimada para sua inativação total é de aproximadamente $10.500 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$.
- O *E.faecalis* pode ser um bom indicador de contaminação, principalmente se utilizado em conjunto com a *E.coli*.

RIALA 6/823

PIRES, M.R.; PISANI, B.; PRANDI, M.A.G.; SIMÕES, M. Desinfection of water with ultraviolet radiation: bactericide efficiency. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 29-34, 1998.

ABSTRACT: Ultraviolet radiation has been accepted as an alternative to chlorination for disinfection of water. The objective of this work is microorganism inactivation survey. A batch reactor, equipped with ultraviolet lamp, was used in the tests. *E.coli*, *P.aeruginosa*, *A.hydrophila*, *E. faecalis* e *V.cholerae* were the microorganism employed for the study of inactivation. The *E.coli* was the bacteria with the strongest initial resistance but the greatest inactivation constant, *E.faecalis* was the most resistant.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Standart Methods for the Examination of **Water and Wastewater**. 18th ed., Washington, A.P.H.A., 1992, p. 9-32-38.

BRAUN, A.M., MAURETTE, M.T., OLIVEROS, E. **Technologie photochimique**. Lausanne: Presses Polytechniques, 1986. 542p.

DANIEL, L.A. **Desinfecção de esgotos com radiação ultravioleta: fotorreativação e obtenção de parâmetros cinéticos**. São Carlos: EESC.USP, 1993. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1993. 164p.

HARM, W. **Biological effects of ultraviolet radiation**. New York: Cambridge University Press, 1980. 216p.

LINDENAUER, K.G., DARBY, J.L. Ultraviolet disinfection of wastewater : effect of dose on

subsequent photoreactivation. **Water Research**. Great Britain, v.28, n.4, p.805-817, 1994.

PIRES, M.R. **Desinfecção de água de abastecimento com radiação ultravioleta: eficiência bactericida e uma análise econômica e energética**. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 88p. Dissertação (Mestrado).

QUALLS, R.G., JOHNSON, J.D. Modeling and efficiency of ultraviolet disinfection systems. **Water Research**. Great Britain: v.19, n.8, p. 1039-1046, 1985.

QUALLS, R.G., JOHNSON, J.D., FLYNN, M.P. The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. **Journal Water Pollution Control Federation**. V.55, n.10, p.1280-1285, out. 1983.

SEVERIN, B.F. Disinfection of municipal wastewater effluents with ultraviolet lights. **Journal Water Pollution Control Feration**. v. 52, n.7, p.2007-2018, jul. 1980.

SOBOTKA, J. The efficiency of water treatment and

disinfection by means of ultraviolet radiation. **Water Science Technology**. Great Britain, v.27, n.3-4, p.343-346, 1993.

TOBIN, R.S., SMITH, D.K., HORTON, A., ARMSTRONG, V.C. Methods for testing the

efficacy of ultraviolet light disinfection devices for drinking water. **Journal American Water Works Association**. P.481-484, set.1983.

Recebido para publicação em 26/08/97

EFEITO DO FERRO NA BIOSSÍNTESE DE AFLATOXINA B₁ POR *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 190443 APÓS INOCULAÇÃO EM DOIS GENÓTIPOS DE AMENDOIM

Guilherme PRADO¹
Ignácio José de GODOY²
Marize Silva de OLIVEIRA¹
Roberto Gonçalves JUNQUEIRA³
Jovita Eugênia Cruz GAZZINELLI-MADEIRA¹

RIALA 6/824

PRADO, GUILHERME e col. - Efeito do ferro na biossíntese de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443 após inoculação em dois genótipos de amendoim. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 35-39, 1998.

RESUMO: Avaliou-se a produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443 em sementes de amendoim, genótipos Tatu Vermelho e VRR-245, cultivados no Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas em 1994/1995 e submetidos a adubação com sulfato ferroso. Após a colheita, os grãos de amendoim foram previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos, e inoculados com uma suspensão de esporos do *Aspergillus flavus* IMI 190443, em três concentrações: 10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL. Observou-se uma menor produção de aflatoxina B₁ no genótipo VRR-245, independente da concentração de esporos de *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL) e do tratamento com e sem sulfato ferroso (p<0,05), quando comparado ao Tatu Vermelho. Verificou-se uma menor contaminação com aflatoxina B₁ nos genótipos Tatu Vermelho e VRR-245, após adubação e inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443, apenas na concentração de 10³ esporos/mL.

DESCRITORES: Amendoim; *Aspergillus flavus*; aflatoxina B₁; adubação; sulfato ferroso.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ocorrendo após a fase de crescimento exponencial dos fungos^{2,3} podendo contaminar as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica¹⁸.

A contaminação dos alimentos com fungos toxigênicos está geralmente relacionada com condições ambientais de cultivo e armazenamento. Segundo ELLIS *et alii*³ os principais fatores que regulam o crescimento do fungo e produção de aflatoxina podem ser ambientais (temperatura, atividade de água, intensidade de luz, pH), químicos (tipo

de substrato, tipo de nutrientes, agentes antifúngicos) e biológicos (variabilidade da linhagem e competição com a microflora).

No Brasil, o número de trabalhos que abordam a contaminação de aflatoxinas em amendoim é muito maior quando se compara com outros substratos¹⁶, sendo que o processo de produção de aflatoxinas pode ser interrompido mediante aquecimento ou refrigeração⁷. Entretanto, métodos utilizados para a destruição da aflatoxina já elaborada não são totalmente efetivos⁸.

Dessa forma, alternativas voltadas para a prevenção da contaminação dos alimentos e a produção de aflatoxinas são linhas de pesquisa em desenvolvimento, como: novos genótipos de amendoim resistentes à infecção do fungo e à produção de aflatoxina⁵; práticas agrícolas recomendadas, como a irriga-

¹Fundação Ezequiel Dias - Divisão de Bromatologia e Toxicologia - Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - Gameleira - Belo Horizonte/MG - 30510-010

²Instituto Agrônomo de Campinas - Caixa Postal 28 - Campinas/São Paulo - 13001-970

³Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais - Av. Olegário Maciel, 2360 - Belo Horizonte/MG.

ção adequada para manter a atividade de água do grão superior a 0,95, valor mínimo necessário para a formação dos estilbenos fitoalexinas, substâncias naturais de defesa das plantas contra a invasão fúngica^{1,9}, e a utilização de solos para cultivo de amendoim com maior retenção de água e menor aeração, onde os níveis de contaminação são menores^{6,13}.

A utilização de substâncias químicas para evitar a contaminação com fungos e/ou a produção de aflatoxinas é também objeto de estudos de alguns pesquisadores. GUPTA *et alii*⁴ e PRADO *et alii*^{11,12} observaram uma correlação entre níveis de metais e produção de aflatoxinas. REDING *et alii*¹⁵ notaram uma menor contaminação de amendoim com aflatoxinas, após inoculação com *Aspergillus parasiticus* NRRL 5139, quando solos foram suplementados com sulfato de cálcio em diferentes níveis. PRADO¹⁰ trabalhando com amendoim em grão, genótipo Tatu Vermelho, observou que alumínio, ferro, níquel e zinco, em diversas concentrações, inibia a produção de aflatoxina B₁ quando se inoculava o *Aspergillus flavus* NRRL 6513 a 26 °C durante 7 dias. E que o ferro, nas três concentrações estudadas (40, 80 e 160 µg/g) além de inibir a biossíntese de aflatoxina impedia totalmente o crescimento vegetativo do fungo.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de Fe (II) na produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443, após adubação com sulfato ferroso, durante o plantio dos genótipos Tatu Vermelho, o mais plantado no Brasil, e VRR-245, originário da Índia e citado na literatura como resistente à produção de aflatoxina⁵.

MATERIAL E MÉTODOS

Planejamento experimental

O plantio foi executado no Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, no dia 19/11/94, em solo classificado como Latossolo Roxo. O ensaio foi implantado segundo o delineamento experimental em blocos casualizados em parcelas subdivididas, com 4 repetições. As subparcelas consistiram dos tratamentos com e sem adição de ferro, via adubação em cobertura com sulfato ferroso. As parcelas principais consistiram de dois genótipos de amendoim: Tatu Vermelho e VRR-245. Cada parcela experimental apresentava 5 linhas úteis de aproximadamente 50 plantas/linha, com espaçamento de 0,70 entre linhas. A área útil por parcela foi de 17,5 m². A colheita foi efetuada em 20/03/95.

Genótipos estudados

O genótipo Tatu Vermelho é do grupo Valência, largamente difundido nas regiões produtoras de amendoim do Brasil, principalmente no estado de São Paulo. As plantas

são de porte ereto, ciclo curto e produzem vagens com predominância de 3 a 4 sementes/vagem. O genótipo VRR-245 foi introduzido no ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), Índia. É de ciclo curto, vagens com duas sementes pequenas, de película clara.

Tratamentos efetuados

Foram aplicados aos 35 dias do plantio (início do florescimento) 180Kg/ha de sulfato ferroso, o equivalente a 50Kg/ha de ferro. O modo de aplicação foi adubação em cobertura, consistindo em esparramar o produto no solo, ao longo da linha das plantas, próximo à região do colo, seguido de leve incorporação com solo.

Dados climáticos

Durante o ensaio, o índice pluviométrico de novembro/1994 a março/1995 foi de 1255,4 mm. A temperatura máxima alcançada foi de 35,4 °C e a mínima de 14,6 °C.

Amostragem

Foram obtidas amostras de cada genótipo, com e sem ferro, formadas a partir da mistura de grãos das respectivas quatro áreas cultivadas. Para o laboratório foi enviado, então, 5,0 Kg/amostra, em um total de 4 amostras.

Preparo das amostras

Para a determinação inicial de aflatoxinas e metais as amostras foram previamente moídas e homogeneizadas. Posteriormente, foram passadas em peneira plástica de abertura 20 mesh. Seguiu-se quarteamento até 1,0 Kg.

Para a determinação da atividade de água utilizou-se grãos inteiros, sem nenhum tratamento prévio.

Para a determinação de aflatoxinas, após inoculação de uma cepa de *Aspergillus flavus*, grãos de amendoim foram previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos para a destruição da microbiota natural.

Cepa de *Aspergillus flavus*

Foi utilizada uma cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443, isolada de pistache da Turquia, forte produtora de aflatoxina B₁, do International Mycological Institute (Inglaterra).

Metodologia

Determinação da atividade de água

Para a determinação da atividade de água, aproximadamente 10g de amostra foi picada e colocada no aparelho

“NOVASINA”, pré-calibrado com soluções salinas saturadas conforme orientação do fabricante.

Suspensão de esporos

Cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443 foi inoculada em placa de Petri contendo o meio de Ágar dextrose batata. Seguiu-se incubação por 7 dias a 37 °C. Após a esporulação, uma alça de platina cheia de esporos foi colocada em um tubo de Eppendorf, contendo aproximadamente 2 mL de Tween 0,1%, e agitado por 1 minuto para dispersão dos esporos. Transferiu-se então 200 µl desta suspensão para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL do meio de Ágar dextrose batata. Incubou-se a 37 °C por 7 dias para esporulação. Adicionou-se 20 mL de Tween 0,1% no frasco e 10 pérolas de vidro. Agitou-se gentilmente e pipetou o sobrenadante para um outro Erlenmeyer. O número de esporos/mL da suspensão foi calculado e ajustado para 10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL. A contagem e o cálculo do número de esporos/mL foi feito através da Câmara de Neubauer. Para a inoculação, utilizou-se 5 mL dessa suspensão para 15g de amendoim previamente autoclavado, em 4 repetições. Seguiu-se incubação por 7 dias a 25 °C.

Determinação de aflatoxinas

Foi utilizado o método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹⁷ para a quantificação de aflatoxina B₁ nas amostras iniciais e após inoculação e incubação.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados e submetidos à análise de variância, adotando o modelo fatorial 2x2, em que os fatores eram genótipo e adubação com e sem sulfato ferroso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectadas aflatoxinas no início do experimento nas amostras analisadas, sendo que os valores de atividade de água variaram de 0,49 a 0,55, o que demonstra que todas as práticas agrícolas recomendadas para o cultivo do amendoim foram executadas.

Os elevados teores de aflatoxina B₁ obtidos na presente investigação (TABELA 1), podem ser atribuídos a potencialidade toxigênica da cepa utilizada, condições adequadas de temperatura e umidade utilizadas e ausência de uma microbiota natural competitiva destruída pelo aquecimento.

Independente do genótipo e do tratamento com e sem ferro, os maiores níveis de aflatoxina B₁ foram obtidos quando a concentração de esporos de *Aspergillus flavus* inoculada era de 10⁴ esporos/mL, observando-se um decréscimo nos teores de aflatoxina B₁ quando o tamanho do inóculo era de 10³ e 10⁵ esporos/mL.

Independente da concentração de esporos de *Aspergillus flavus* (10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL) e o tratamento com e sem sulfato ferroso, os níveis de aflatoxina B₁ encontrados nos grãos do genótipo VRR-245 foram inferiores e variaram significativamente (p < 0,05) em relação aos determinados no Tatu Vermelho. Tais resultados confirmam o atributo do genótipo VRR-245 em apresentar uma maior resistência à produção de aflatoxinas^{5,14}.

Considerando-se a aplicação de sulfato ferroso em cada um dos genótipos estudados, observou-se que nos grãos de amendoim do genótipo Tatu Vermelho, inoculados com *Aspergillus flavus* (10³ esporos/mL), os valores de aflatoxina B₁ diferiram significativamente (p < 0,05), indicando um efeito positivo da adubação, visto que os valores encontrados de aflatoxina B₁ nas amostras tratadas com ferro foram praticamente a metade dos níveis determinados nas amostras sem ferro.

No genótipo VRR-245, não foi observado diferença significativa entre os níveis de aflatoxina B₁ nos grãos tratados e não tratados com ferro, indicando que talvez a

TABELA 1

Teores de aflatoxina B₁ de dois genótipos de amendoim, Tatu Vermelho e VRR-245, cultivados em latossolo roxo, com e sem adubação com sulfato ferroso, e inoculados com *Aspergillus flavus* IMI 190443.

Tratamentos	Aflatoxina B ₁ (µg/g)*		
	<i>A. flavus</i> IMI 190443 (esporos/mL)		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Com adubação			
Tatu Vermelho	34,25 _b	88,30 _a	55,20 _a
VRR - 245	11,55 _c	56,28 _b	37,50 _b
Sem adubação			
Tatu Vermelho	63,30 _a	73,58 _a	55,75 _a
VRR - 245	14,33 _c	31,45 _c	30,90 _c

* Médias (4 repetições) seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

maior resistência natural desse genótipo tenha prevalecido, quando a concentração de esporos de *Aspergillus flavus* era de 10³ esporos/mL. Entretanto, em concentrações mais elevadas, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL, os níveis de aflatoxina B₁ foram maiores nos grãos provenientes de solo adubado com ferro, ao nível de significância de 5%, indicando que a planta deve apresentar um limite natural de resistência e/ou que a adubação possa ter afetado sua fisiologia.

No genótipo Tatu Vermelho, não houve diferença significativa entre os níveis de aflatoxina B₁ encontrados nos grãos tratados e não tratados, quando a concentração de esporos de *Aspergillus flavus* era de 10⁴ e 10⁵ esporos/mL, indicando também que o efeito tamanho do inóculo tenha prevalecido sob o efeito tratamento com ferro.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram uma maior resistência do genótipo VRR-245, originária da Índia, em relação ao Tatu Vermelho, o mais cultivado no Brasil, quanto à produção de aflatoxina B₁, após inoculação com uma cepa

produtora, em condições ideais de temperatura e umidade. Pesquisas que envolvam verificação da contaminação natural dessas duas variedades com aflatoxina B₁, no período pós-colheita e durante o armazenamento, podem ratificar esse atributo do genótipo indiano e servir como alternativa aos produtores no Brasil.

A menor contaminação com aflatoxina B₁ do genótipo Tatu Vermelho, após adubação com sulfato ferroso e inoculação com *Aspergillus flavus* (10³ esporos/mL), é um dado promissor, mas que deve ser testado em outras condições experimentais para ratificar um possível efeito protetor do ferro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e ao Dr. Benedito Corrêa do Instituto de Ciências Biomédicas/USP pela determinação da atividade de água das amostras de amendoim.

RIALA 6/824

PRADO, GUILHERME et al. - Effect of iron on the biosynthesis of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* IMI 190443 after inoculation in two peanuts genotypes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 35-39, 1998.

SUMMARY: EFFECT OF IRON ON THE BIOSYNTHESIS OF AFLATOXIN B₁ BY *Aspergillus flavus* IMI 190443 AFTER INOCULATION IN TWO PEANUTS GENOTYPES. Production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* IMI 190443 in peanuts seeds from Tatu Vermelho and VRR-245 genotypes was evaluated. They were raised in Campinas Experimental Center of Instituto Agrônomico during 1994/1995 and the ground was supplemented with iron sulfate. After harvested seeds were autoclaved at 121 °C for 20 minutes and inoculated with *Aspergillus flavus* spore suspension in three concentrations: 10³, 10⁴ e 10⁵ spores/mL. The production of aflatoxin B₁ was less in VRR-245 genotype even so the concentration of *Aspergillus flavus* was different (10³, 10⁴ e 10⁵ spores/mL) and the supplementation was with or without iron sulfate (p<0,05), when it is compared to Tatu Vermelho. A less amount of aflatoxin B₁ was found in Tatu Vermelho and VRR-245 genotypes when it was supplemented and inoculated with *Aspergillus flavus* only at the concentration of 10³ spores/mL.

DESCRIPTORS: Peanut; *Aspergillus flavus*; aflatoxin B₁; supplementation; iron sulfate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DORNER, U. L. ; COLE, R. J. ; SANDERS, T. H. ; BLANKENSHIP, P. D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity and phytoalexin production in preharvest aflatoxin of drought-stressed peanuts. *Mycopathol.*, 105: 117-128, 1989.
2. DUTTON, M. F. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 52: 274-295, 1988.
3. ELLIS, W.O. ; SMITH, J. P. ; SIMPSON, B. K. ; OLDHAM, J. H. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30: 403-439, 1991.
4. GUPTA, S. K. ; MAGGON, K. K. ; VENKITASUBRAMANIAN, T.A. Effect of zinc on adenine nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 753-756, 1976.
5. MEHAM, V. K. ; MCDONALD, D. ; RAMAKRISHNA, N. Varietal resistance in peanut to aflatoxin production. *Peanut Sci.*, 13: 7-10, 1986.
6. MEHAN, V. K. ; MAYEE, C. D. ; JAYANTHI, S. ; MCDONALD, D. Preharvest seed infection by

- Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin contamination in groundnuts in relation to soil types. *Plant and Soil*, 136: 239-248, 1991.
7. MIROCHA, C. J. Historical aspects of mycotoxicology and developments in aflatoxicosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS, 6-8 Sept. 1981, Cairo. *Proceedings ...* Cairo: Food and Drug Administration, 1983. 187p. p. 23-31.
 8. MOSS, M. O. *Mycotoxins of Aspergillus and other filamentous fungi*. In: *Filamentous fungi in foods and feeds*. Oxford: Blackwell Scientific, 1989. 149p. p. 69-81.
 9. MUSINGO, M. N. ; BASHA, S. M. ; SANDERS, T. H. ; COLE, R. J. ; BLANKENSHIP, P. D. Effect of drought and temperature stress on peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed composition. *J. Plant Phys.* , 134: 710-715, 1989.
 10. PRADO, G. *Influência de alumínio, ferro, níquel e zinco na produção de aflatoxina B₁ pelo Aspergillus flavus* NRRL 6513 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) - variedade Tatu Vermelho. Dissertação. Mestrado em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. 1992. 110p.
 11. PRADO, G. ; ALVAREZ-LEITE, E. M. ; MARTINS-VIEIRA, M. B. C. ; OLIVEIRA, M. S. Correlação entre níveis de metais e aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Bol. SBCTA*, 28: 33-40, 1994.
 12. PRADO, G. ; ALVARES-LEITE, E. M. ; MARTINS VIEIRA, M. B. C. ; OLIVEIRA, M. S. Influência de metais na produção de aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 15: 294-297, 1995.
 13. PRADO, G. ; MARTINS VIEIRA, M. B. C. ; OLIVEIRA, M. S. Contaminação fúngica e níveis de aflatoxinas em amendoim recém-colhido cultivado em dois tipos de solo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 16: 72-74, 1996.
 14. PRADO, G. ; GODOY, I. J. ; OLIVEIRA, M. S. ; MARTINS VIEIRA, M. B. C. Influência de ferro na biossíntese de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* NRRL 5940 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) variedades Tatu Vermelho e VRR-245. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 16: 22-25, 1996.
 15. REDING, C. L. C. ; HARRISON, M. A. ; KVIEN, C. K. *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin synthesis on florunner peanuts grown in gypsum-supplemented soil. *J. Food Protec.* , 56: 593-611, 1993.
 16. SABINO, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciênc. Cult.* , 45: 359-371, 1993.
 17. SOARES, L. M. V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , 73: 22-26, 1989.
 18. WHO- Environmental Health Criteria 11: *Mycotoxins*. Geneve, Word Health Organization, 1979. 127p.

Recebido para publicação em 16/04/97

TEOR DE VITAMINA A EM ALIMENTOS ENRIQUECIDOS *

Rosa Maria Duarte FÁVARO**
Neusa Santesso GARRIDO**
Wilma Delphina de Oliveira GAROTTI**
Cristina Eico YOKOSAWA**
Maria Helena IHA**
Alceu Afonso JORDÃO JR.***
Hélio VANNUCCHI***

RIALA 6/825

FÁVARO, R. M. D. e col. - Teor de vitamina A em alimentos enriquecidos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 41-48, 1998.

RESUMO: A diversidade de produtos alimentícios adicionados de vitaminas, inclusive de vitamina A, vem aumentando no Brasil e o controle desses produtos é necessário. Os objetivos desse estudo foram: 1) verificar o teor de vitamina A em alimentos enriquecidos avaliando a concentração em relação ao declarado no rótulo; 2) verificar a variabilidade dos níveis de enriquecimento desse nutriente em diferentes amostras de um mesmo produto; 3) avaliar a quantidade de vitamina A oferecida em uma porção individual de cada alimento em relação à Dose Diária Recomendada (DDR) pelo National Research Council. Foram estudados 20 produtos enriquecidos. A concentração de vitamina A foi determinada em 5 amostras provenientes de lotes diferentes de cada produto, totalizando 100 amostras. Dentre as amostras avaliadas, 45 apresentaram teor de vitamina A na faixa compreendida entre 20% abaixo e 20% acima do declarado no rótulo, 14 amostras apresentaram teor abaixo dessa faixa e 41 acima. A maioria dos produtos apresentou níveis de enriquecimento homogêneo em cinco amostras diferentes. Os alimentos estudados supriam de 18 a 120% das DDR em uma porção única. Sugere-se que a legislação brasileira estabeleça, para alimentos enriquecidos, níveis mínimo e máximo de vitamina A por porção diária habitualmente consumida; que se estenda o benefício dos alimentos enriquecidos com vitamina A às populações de baixa renda através da adição desse nutriente nos alimentos consumidos pela mesma; que se avalie melhor os alimentos que não podem e aqueles que podem e devem ser enriquecidos.

DESCRITORES: Vitamina A, alimentos enriquecidos, legislação, porcentagem da Dose Diária Recomendada, teor de enriquecimento.

INTRODUÇÃO

O enriquecimento ou fortificação (nutrificação^(a)) de alimentos tem sido realizado em muitos países do mundo, principalmente com vitaminas e minerais, com o objetivo de prevenir a deficiência de nutrientes⁽²⁴⁾. Além disso, o enriquecimento de alimentos vem se tornando cada vez

mais importante do ponto de vista de *marketing*, atraindo consumidores e proporcionando aos produtos uma posição mais sofisticada no mercado.

No Brasil, a oferta de alimentos enriquecidos com diversos nutrientes, inclusive com vitamina A, vem aumentando e tem-se atualmente disponíveis no mercado produtos cárneos, leites e derivados, sorvetes, achocolatados,

* Trabalho apresentado no IV Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2 – 5 Dezembro de 1996, São Paulo – SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto
Rua Minas, 877 - Campos Elíseos - CEP 14085-410 - Ribeirão Preto - SP.

*** Da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Disciplina de Nutrição
Av. Bandeirantes, 3900 - CEP 14049-900 - Ribeirão Preto - SP.

^(a) O termo “nutrificação” foi sugerido por J. C. Bauernfeind para evitar a confusão que causam as diferenças triviais entre termos como “fortificação”, “enriquecimento” e “restauração” englobando um conceito único de “adição de nutrientes aos alimentos”.

produtos a base de cereais, pós para mingaus e pós para *milk shakes*, entre outros. Estes produtos são, entretanto, consumidos com maior frequência por pessoas das classes média e alta, não atingindo as populações de baixa renda onde a deficiência de vitamina A e outros nutrientes é mais freqüentemente observada, inclusive como problema de Saúde Pública^(2, 11, 14, 22, 23, 27). Vários alimentos, consumidos por indivíduos de todas as classes sócio-econômicas principalmente as menos privilegiadas, têm sido estudados no Brasil e no mundo e apontados como bons veículos para o enriquecimento com vitamina A, como por exemplo o óleo de soja^(10, 12, 13), o arroz⁽¹⁶⁾, a farinha de trigo⁽³⁾.

Até a presente data não existem regulamentos comuns para o enriquecimento de alimentos nem mesmo nos países do Mercado Comum Europeu, sendo que cada um possui suas próprias leis.

Na legislação brasileira, a Resolução 12/78 do CNNPA⁽⁵⁾ traz os parâmetros para esses tipos de alimentos. De acordo com essa Resolução, para que os alimentos enriquecidos de vitaminas e/ou sais minerais possam ser assim denominados, devem fornecer na porção média diária ingerida 60% no mínimo da Dose Diária Recomendada (DDR) para adultos segundo o National Research Council, 1974.⁽²⁰⁾ É permitida a adição de até 100% a mais de vitaminas, exceto vitamina D, para compensar as perdas eventuais decorrentes do tempo de armazenamento do alimento, sendo que esse excesso de adição deve ter sua necessidade comprovada.

Nos Estados Unidos as fórmulas infantis, por exemplo, possuem níveis adequados e limites superiores para vitaminas A e E aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration)⁽¹⁹⁾. Na Europa, somente nutrientes que suprem pelo menos 15% da DDR podem ser mostrados no rótulo, mas os limites superiores nem sempre estão estabelecidos⁽²⁵⁾. Na Grã-Bretanha, um alimento enriquecido deve suprir 50% das recomendações por porção diária habitualmente consumida⁽¹⁷⁾. A França, com regulamentos mais rígidos, determina os alimentos que podem ser enriquecidos e estabelece que os mesmos devem conter de 15 a 40% das recomendações por 100 Kcal do produto acabado^(4, 17). A Suíça, que tem longa tradição na área de enriquecimento, permite declaração de 1/3 da DDR até, no máximo, 1 DDR por porção diária do alimento enriquecido, sendo que esses produtos são anualmente coletados no comércio e analisados por dois institutos especializados.^(24, 25)

O controle dos alimentos enriquecidos é importante para proteger o consumidor de declarações enganosas contidas nos rótulos e possíveis doses altas em quantidades tóxicas, principalmente quando se trata de nutriente como a vitamina A a qual não deve ser ingerida abaixo das recomendações mas, também, não deve ser ingerida em quantidades excessivamente altas, principalmente durante a gestação⁽²⁶⁾.

Os objetivos desse estudo foram: 1) verificar o teor de vitamina A em alimentos enriquecidos avaliando a concentração em relação ao declarado no rótulo; 2) verificar a variabilidade dos níveis de enriquecimento desse nutriente em diferentes amostras de um mesmo produto; 3) avaliar a quantidade de vitamina A oferecida em uma porção individual de cada alimento em relação à Dose Diária Recomendada (DDR) pelo National Research Council.

MATERIAL E MÉTODO

a) Amostra

Foram estudados 20 produtos alimentícios enriquecidos com vitaminas, inclusive com vitamina A, abrangendo 10 tipos de alimentos. De cada produto foram analisadas 5 amostras provenientes de lotes diferentes, totalizando 100 amostras. Esses produtos foram adquiridos, ao acaso, em supermercados de grande e médio porte da cidade de Ribeirão Preto - SP. Os produtos analisados foram: 3 marcas de achocolatados em pó, 3 de pós para mingaus, 3 de leites com chocolate em embalagem tetrapack, 3 de cereais matinais, 3 de queijos tipo *petit-suisse*, 1 de complemento alimentar, 1 de farinha láctea, 1 de leite esterilizado integral, 1 produto cárneo e 1 pó para milk shake. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade estabelecido pelo fabricante.

b) Preparo das amostras

A concentração de vitamina A foi determinada logo após a abertura da embalagem em duas porções, sendo que uma foi retirada da parte superior da embalagem e outra da parte inferior. A concentração final de cada amostra foi obtida pela média das 2 determinações.

c) Métodos analíticos

A vitamina A foi quantificada pelo método colorimétrico (reação de Carr-Price), de acordo com o A.O.A.C, 1995⁽¹⁾. Cada porção retirada da embalagem foi homogeneizada e uma alíquota variando de 10 a 20 g foi saponificada após a adição de um volume de álcool etílico (mL) igual a 4 vezes o peso (g) da amostra; hidróxido de potássio 50% (p/v) (mL) igual ao peso (g) da amostra e 100 mg de hidroquinona. Para produtos com baixo teor de gordura foi adicionado 1 g de óleo de soja. A extração foi realizada com 100 ou 200 mL de éter de petróleo, divididos em 4 ou 6 frações. Uma alíquota de 5 ou 10 mL foi evaporada sob nitrogênio, ressuspensa com clorofórmio e a vitamina A determinada a 620 nm após adição do reagente de cor - TFA : clorofórmio (1:2).

Uma amostra de cada um dos 20 produtos foi, também, analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com Brubacher et al⁽⁶⁾. Após

saponificação e extração (como descrito acima), uma alíquota de 5 ou 10 mL foi evaporada sob nitrogênio e ressuspensa na fase móvel (q.s.p. 10 mL). As condições cromatográficas foram as seguintes: equipamento Shimadzu LC-9A, detector UV/Vis-modelo SPD-6AV, coluna shim-pack-ODS (0,46 x 25 cm), precedida de coluna de guarda ODS (C18) (0,46 x 1 cm), fase móvel acetonitrila : diclorometano: metanol (70: 20: 10), fluxo de 1,5 mL / min, sistema simples de eluição, vazão de 1,5 mL / min, leitura a 325 nm.

As concentrações das soluções-padrão de retinol, nas duas técnicas, foram corrigidas através da absorvidade do retinol em etanol a 325 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1850$).

Foi calculado o coeficiente de correlação entre os resultados obtidos com as duas técnicas. O coeficiente de variação (%CV) para cada método foi calculado após análise de um produto proveniente de uma mesma embalagem (10 análises de leite esterilizado com chocolate). Foi realizado teste de recuperação para cada produto estudado, sendo a quantificação de vitamina A realizada pelas duas técnicas.

d) Cálculo da porcentagem (%) da Dose Diária Recomendada oferecida em uma porção individual de cada produto.

Para cada produto estudado foi calculada a % da Dose Diária Recomendada pelo National Research Council, 1989⁽²¹⁾, oferecida em uma porção individual.

A concentração de vitamina A utilizada para os cálculos foi obtida a partir da média das concentrações encontradas nas 5 amostras de cada produto, após a análise.

As informações dos rótulos foram utilizadas apenas para a estimativa do peso ou volume de alimento consumido em uma porção individual.

Tanto a quantidade ingerida em uma porção quanto as Recomendações Diárias foram para adultos, com exceção dos queijos tipo *petit-suisse* e dos pós para mingaus, especialmente produzidos e consumidos por crianças, para os quais foram observadas a ingestão e recomendações para as mesmas (DDR para adultos = 3333 UI/dia = 1000 ER/dia; DDR para crianças de 1 a 3 anos = 1333 UI/dia = 400 ER/dia).⁽²¹⁾

RESULTADOS

A Figura 1 mostra o teor de vitamina A encontrado nas amostras de cada um dos produtos alimentícios estudados em relação ao declarado no rótulo.

A Tabela 1 mostra o teor de vitamina A nos produtos estudados e a faixa de variação observada em 5 embalagens, provenientes de lotes diferentes. A quantidade de vitamina A oferecida por 5 produtos (pós para mingau A e C, cereais matinais A e B e queijo *petit suisse* A) variou bastante de um lote para outro (com uma variação maior do que o dobro entre o menor e o maior valor obtido). Os achocolatados em pó A, B e C, o leite com chocolate A e B, o queijo *petit suisse* C, a farinha láctea, o complemento alimentar, o leite esterilizado e o produto carne foram dentre os produtos estudados, os que mostraram a menor variação na concentração de vitamina A entre os 5 lotes (com uma variação de 1 a 1,5 vezes entre o menor e o maior resultado obtido)

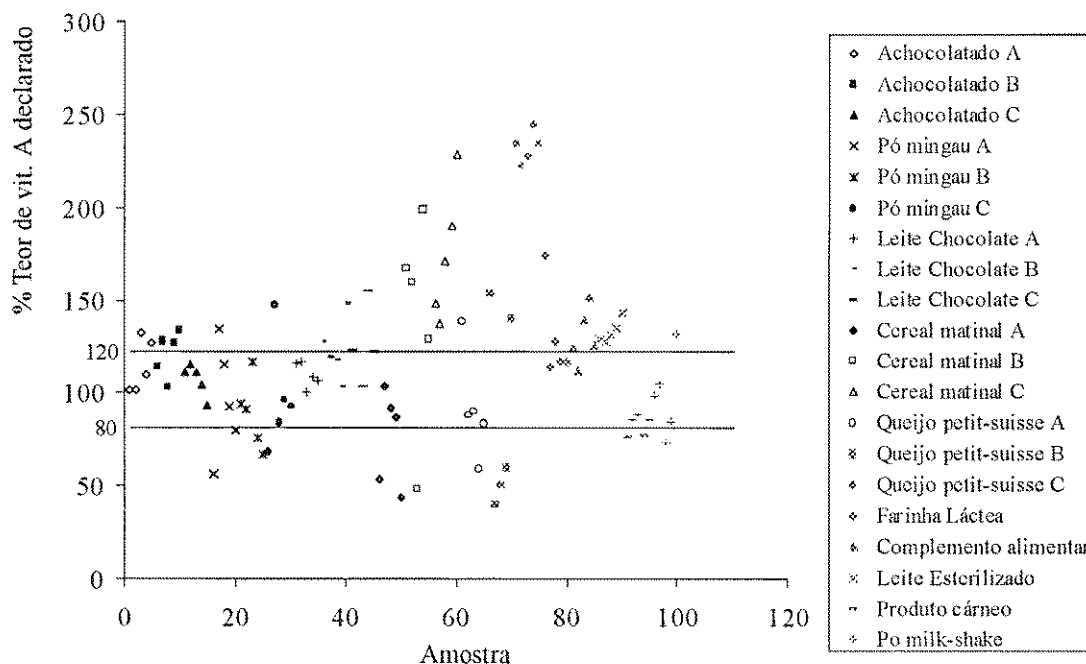


Figura 1: Vitamina A em alimentos enriquecidos (% do declarado)

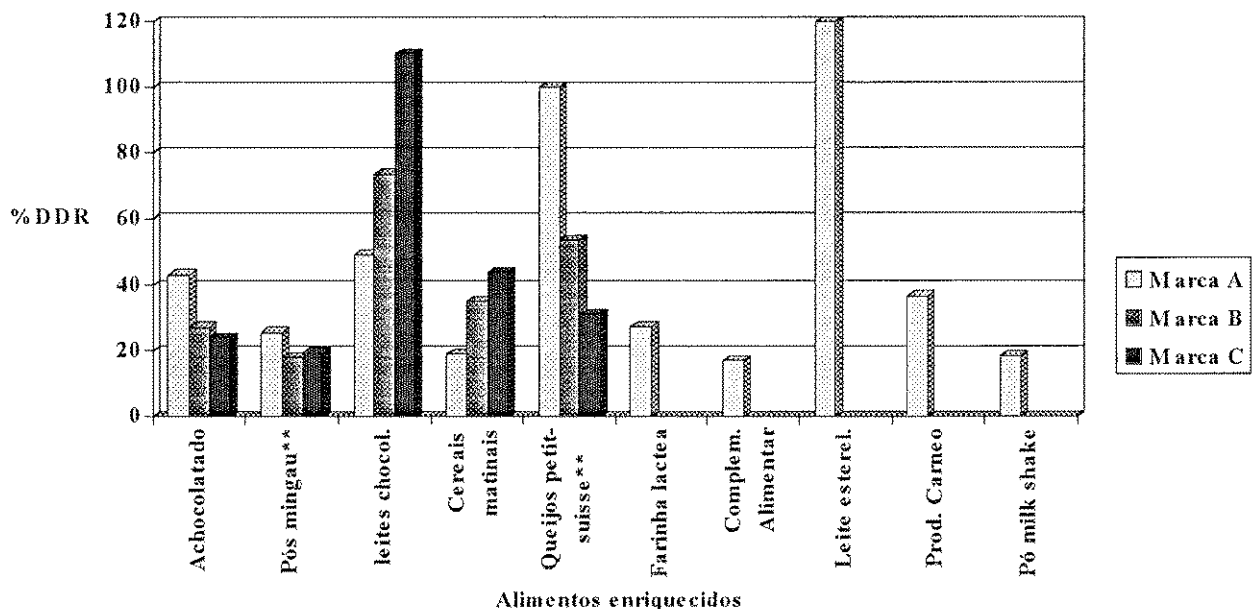
TABELA 1
Teor de Vitamina A em Alimentos Enriquecidos

Produto	n	Teor de vitamina A * (UI/100 g)			Faixa de variação
		Declarado	Observado		
Achocolatado A	5	5000	5710,8	± 725,1	5057,5 - 6620,5
Achocolatado B	5	3000	3628,4	± 381,3	3069,0 - 3841,0
Achocolatado C	5	3000	3198,7	± 265,1	2778,5 - 3455,0
Pó p/ mingau A	5	1700	1624,3	± 518,1	954,3 - 2286,3
Pó p/ mingau B	5	1333	1181,1	± 255,9	887,6 - 1553,8
Pó p/ mingau C	5	1333	1298,3	± 401,0	908,8 - 1970,4
Leite c/ chocolate A	5	750	820,1	± 51,3	750,9 - 872,8
Leite c/ chocolate B	5	1000	1226,9	± 168,7	1022,4 - 1481,6
Leite c/ chocolate C**	5	750 - 1500 **	1329,3	± 702,4	766,2 - 2313,7
Cereal matinal A	5	2775	2102,0	± 714,2	1217,7 - 2871,8
Cereal matinal B	5	2775	3897,6	± 1600,8	1319,4 - 5540,5
Cereal matinal C	5	2081	3644,1	± 754,3	2852,6 - 4754,2
Queijo petit-suisse A	5	3330	3050,5	± 972,4	1963,0 - 4630,8
Queijo petit-suisse B**	5	1111 - 3111**	1579,7	± 234,8	1225,6 - 1862,8
Queijo petit-suisse C	5	396	920,4	± 32,9	880,7 - 967,9
Farinha láctea	5	1000	1298,4	± 257,3	1136,6 - 1749,4
Complemento alimentar	5	1100	1433,6	± 170,1	1229,0 - 1668,7
Leite esterilizado	5	1500	1996,8	± 96,9	1915,4 - 2151,3
Produto cárneo	5	3000	2453,2	± 150,6	2276,8 - 2619,1
Pó p/ milk shake	5	3000	2946,1	± 676,2	2181,8 - 3957,5

* Média ± DP

** Produtos que apresentaram a quantidade declarada de vitamina A alterada durante o período de estudo.

FIGURA 2:
Quantidade média de vitamina A oferecida em uma porção dos produtos estudados (%DDR*)



* DDR = 3333 UI/dia para adulto - De acordo com o National Research Council - Washington DC, 1989

** DDR = 1333 UI/dia para crianças (1 a 3 anos) - De acordo com o National Research Council - Washington DC, 1989

A Figura 2 mostra a quantidade média de vitamina A oferecida em uma porção única dos alimentos estudados, em relação à Dose Diária Recomendada.

Os resultados obtidos pelos métodos colorimétrico e CLAE, nas 20 amostras analisadas (1 de cada produto)

apresentaram alta correlação ($r = 0,99$; $p < 0,001$), como mostra a Figura 3. O coeficiente de variação (% CV) para o método colorimétrico e CLAE foi respectivamente 5,2 e 5,9 (10 análises de leite esterilizado com chocolate, de uma mesma embalagem). A recuperação obtida (média dos

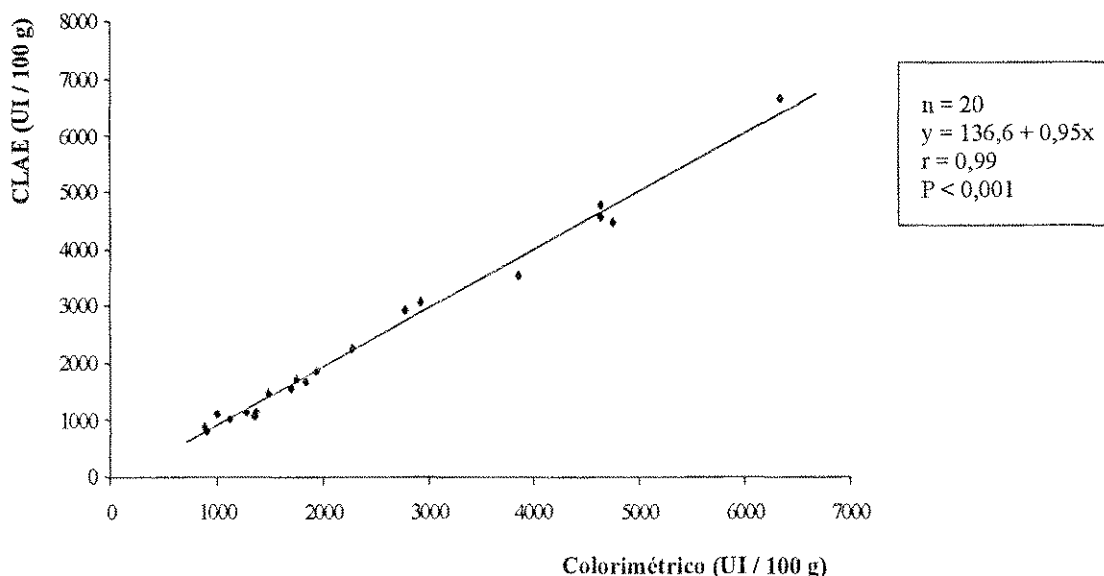


Figura 3: Correlação entre as concentrações de vitamina A obtidas com os métodos colorimétrico e CLAE

valores encontrados para os 20 produtos) foi $93,9 \pm 7,0\%$ e $95,0 \pm 8,2$ respectivamente para o método colorimétrico e CLAE.

DISCUSSÃO

O método oficial para dosagem de vitamina A em alimentos descrito no AOAC, 1995 ⁽¹⁾ utiliza a reação colorimétrica de Carr-Price. Porém, técnicas analíticas mais modernas, como o CLAE, estão sendo cada vez mais utilizadas e acreditadas. Para os produtos aqui estudados, observou-se uma alta correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas, como mostra a Figura 3.

Os dados deste estudo mostram que praticamente metade (45) das amostras analisadas apresentaram teor de vitamina A próximo ao declarado no rótulo (na faixa entre 20% abaixo até 20% acima do declarado). Oitenta por cento das amostras apresentaram teor entre 20% abaixo e 100% acima do declarado. De acordo com a Resolução 12/78 da CNNPA ⁽⁵⁾, é permitida a adição de até 100% a mais de vitaminas, exceto a vitamina D, para compensar as perdas eventuais decorrentes do tempo de armazenamento do alimento. Apenas três amostras continham menos de 50% do declarado e nenhuma delas teor inferior a 40%. Dentre essas 3 amostras, uma era do queijo tipo *petit-suisse* da marca B, uma do cereal da marca A e uma do cereal da marca

B. Seis amostras apresentaram teor ligeiramente superior ao dobro do declarado. Dessas, cinco pertenciam a um mesmo produto (queijo tipo *petit-suisse* C) cujo teor observado não ultrapassou 31% das recomendações diárias em uma porção individual, em nenhuma das amostras.

Estudo realizado por Halen et al, 1989⁽¹⁸⁾ na Suécia, com 121 amostras de produtos lácteos suplementados com vitamina A e D mostrou, em relação ao teor de vitamina A, que 89% das amostras estavam na faixa de 15% abaixo até 15% acima do declarado, 8% estavam abaixo dessa faixa e 3% estavam acima.

Os produtos aqui estudados, com teores de vitamina A inferiores a 80% do declarado, de modo geral, não apresentavam tempo de prateleira avançado e inclusive, outras amostras provenientes de lotes diferentes desses mesmos produtos, apresentavam teores mais próximos ou superiores a 100% do declarado, apesar de maior tempo de fabricação. Portanto, o tempo de armazenamento não pode ser apontado como a causa desses baixos teores. Outras variáveis como temperatura e umidade durante o armazenamento não foram verificadas. A perda de vitamina A devido ao armazenamento tem sido avaliada em outros estudos, e os resultados mostram que o tempo de estabilidade dessa vitamina depende, entre outras variáveis, do alimento enriquecido, da umidade e temperatura durante o armazenamento ^(7,12,16). De qualquer forma, as indústrias devem compensar

as perdas que podem ocorrer durante o armazenamento, para que durante o período de validade do produto o teor de vitaminas esteja de acordo com o declarado no rótulo, como previsto na resolução 12/78 da CNNPA ⁽⁵⁾.

Os resultados desse estudo (Tabela 1) sugerem que, para alguns dos produtos avaliados, o processo de produção não mantém níveis de enriquecimento adequadamente homogêneos nos diferentes lotes sendo que, um mesmo produto pode fornecer mais do que o dobro da quantidade de vitamina A de um lote para o outro. Isto ocorreu, principalmente, devido ao baixo teor apresentado em alguns lotes desses produtos e não devido a quantidades muito acima das declaradas. Esses produtos foram os pós para mingau A e C, os cereais matinais A e B e o queijo *petit-suisse* A. Já os achocolatados em pó A, B e C, os leites com chocolate A e B, o complemento alimentar, o leite esterilizado e a farinha láctea mantiveram nas 5 amostras níveis de enriquecimento adequados, ou seja, homogêneos e sempre próximos de 100% da quantidade declarada no rótulo (10% abaixo até 50% acima). O queijo *petit-suisse* C também fornecia em todos os lotes, quantidades semelhantes de vitamina A, porém sempre acima de 200% do declarado.

Quanto à quantidade de vitamina A oferecida pelos produtos aqui avaliados (Figura 2), observa-se que o leite com chocolate em embalagem tetrapack da marca C e o leite esterilizado ofereceram em média 110 e 120% respectivamente, da DDR de acordo com o National Research Council, 1989, em apenas uma porção individual de 200 mL (um copo). O queijo *petit-suisse* da marca A também ofereceu 100% das DDR para crianças em 45 gramas (um potinho). A quantidade de vitamina A adicionada em uma porção nesses produtos deveria estar dividida em duas ou mais, uma vez que, de todos os alimentos citados, podem ser ingeridos mais do que uma porção por dia. Além disso, os consumidores destes produtos tem acesso, simultaneamente, a outros alimentos enriquecidos e/ou fonte natural de vitamina A.

Alguns produtos tiveram a quantidade de vitamina A declarada no rótulo alteradas durante ou após o período de estudo. É o caso do leite esterilizado da marca avaliada que, quando estudado, declarava 3000 UI/200 mL e passou, nos últimos meses, a declarar 600 UI/200 mL. Outras marcas de leites esterilizados não analisados neste estudo apresentaram alterações semelhantes na quantidade de vitamina A declarada. O queijo tipo *petit-suisse* da marca B no início do estudo declarava quantidades semelhantes aos da marca A oferecendo 100% da DDR para crianças em uma porção mas, em seguida, passou a adicionar metade da quantidade inicial. Já o leite com chocolate em embalagem tetrapack da marca C, que no início declarava 1500 UI / 200 mL passou a 3000 UI / 200 mL, durante o período de estudo. Essas alterações demonstram que as próprias indústrias, algumas vezes, percebem estar adicionando quantidades de vitamina A inadequadas. De acordo com as nossas observações, essas alterações quando ocorrem são geralmente demoradas.

Portanto, a legislação brasileira para alimentos enriquecidos deveria estabelecer quantidades mínima e máxima de vitamina A a ser adicionada por porção média diária consumida. Essa faixa de variação auxiliaria principalmente, as indústrias com pouca experiência na área de adição de nutrientes, a oferecer a seus clientes quantidades adequadas de vitamina A. Representaria, também, uma proteção ao consumidor brasileiro, uma vez que a vitamina A não deve ser ingerida em excesso principalmente por gestantes, cuja dose diária segura, segundo a Organização Mundial da Saúde, não deve ultrapassar 10000 UI/dia ⁽²⁶⁾ (3 copos de leite com 3000 UI/200 mL, quantidade declarada por algumas marcas de leite durante o período de estudo, já ofereceriam 9000 UI / dia. De acordo com os nossos dados o leite estudado ofereceu em média de 5 amostras 3992 UI/200 mL e portanto 11900 UI em 3 copos)

Dentre os alimentos estudados, os que continham menos vitamina A supriam em uma única porção de 18 a 25% da DDR (Figura 2) sendo que o consumo de 3 porções forneceria quantidades muito próximas de 60% da DDR, o que está de acordo com a legislação atual vigente no país ⁽⁵⁾. O produto a base de cereais A, os pós para mingaus das marcas B e C e o pó para *milk shake* apresentaram teor de vitamina A inferior ao declarado em algumas das amostras estudadas, e por isso não atingiram pelo menos 20% das DDR em uma porção individual, quantidade essa que supriria 60% da DDR com a ingestão de 3 porções.

Durante o período desse estudo, foi possível observar que novos produtos enriquecidos, inclusive com vitamina A, foram lançados no mercado e que produtos já comercializados passaram a ser adicionados desse nutriente. Alguns, inclusive, são alimentos que até então não eram enriquecidos no Brasil, como por exemplo sorvetes. Porém em nenhum dos casos tratava-se de produto alimentício consumido pela população de baixa renda. Devido a importância da adição de nutrientes a alimentos como ação preventiva de deficiência de micronutrientes, alguns países promulgaram leis que tornam compulsória a adição de vitaminas e minerais em alimentos de largo uso pela população ⁽¹⁵⁾. A legislação brasileira só obriga adicionar vitamina A nas margarinas (15000 – 50000 UI/Kg) para reproduzir a composição de seu alimento sucedâneo, a manteiga e o enriquecimento do leite em pó para programas de alimentação complementar ⁽⁵⁾.

CONCLUSÕES

1. É necessário estender os benefícios dos alimentos enriquecidos com vitamina A às populações de baixa renda. Isso é possível com a adição de vitamina A à alimentos de largo consumo pela população.
2. A legislação brasileira deve estabelecer teores mínimo e máximo de vitamina A para o enriquecimento de alimentos.

3. É necessário avaliar e estudar melhor os alimentos que podem e devem ser enriquecidos e aqueles que não podem. Esse aspecto não está previsto na legislação brasileira e tem-se, atualmente, uma grande variedade desses produtos tendendo aumentar o número com o decorrer do tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Myrna Sabino do Instituto Adolfo Lutz - Central pelas informações prestadas e referências bibliográficas concedidas.

RIALA 6/825

FÁVARO, R. M. D. et al - Vitamin A concentration in enriched foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 41-48, 1998.

ABSTRACT: The diversity of vitamin A enriched foodstuffs is increasing in Brazil, and the control of these products is necessary. The objectives of this study were to determine: 1) the vitamin A concentration of enriched foods and to compare it to the value declared on the label; 2) the variability in the levels of vitamin A enrichment between different samples of the same product; 3) the vitamin A supply in a single portion. We examined twenty enriched foodstuffs. The vitamin A concentration was determined in five samples of each product completing 100 samples. Forty-five samples had vitamin A concentrations between 20% above or 20% below the label specification, 14 had a concentration above of this range, and 41 below. Most foodstuffs showed an adequately homogeneous level of vitamin A enrichment in five different samples. The vitamin A supply of a single portion was 18% to 120% of the RDA (National Research Council). We suggest that the Brazilian Legislation should establish a range of levels of vitamin A-enriched foods to the daily portion that it extends the benefit of food enriched with vitamin A to the low income population by adding this nutrient to the food that is consumed; and the selected foodstuff for enrichment should be better studied.

DESCRIPTORS: Vitamin A, enriched foodstuff, legislation, percentage of the recommended dietary allowance, level of enrichment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Virginia. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International. 16 ed. Vol II. A.O.A.C. International, Arlington, 1995.
2. ARAÚJO, R.L.; ARAÚJO, M.B.G.; SIERO, R.O.; MACHADO, R.P.P. & LAITE, R.V. Diagnóstico da situação de hipovitaminose A e da anemia nutricional na população do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 36(4):642-650, 1986.
3. ARROYAVE, G. Nutrición de alimentos com ênfasis en el agregado de micronutrientes a la harina de trigo. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 43(3):186-190, 1993.
4. BLANDIN, A.; DIANCOURT, S.; DUPORT, M.H.; FERRY, M.; GARCIA, I.; PRUD'HOMME, C.; ROCHETTE, M. & SAUNIER, F. Les Aliments "vitaminés" sur le marché. *Cah. Nutr. Diét.* XXVI (1):87-89, 1991.
5. BRASIL, Leis, Decretos, etc. Resolução 12/78 CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), de 30 de março 78. *Diário Oficial*, Brasília, 24 de julho de 1978, Seção I - Parte I.
6. BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. Methods for the determination of vitamins in food: recommended by COST 91. London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 1985. Cap. 2, p. 23 - 32: Vitamin A (retinol and Retinyl Esters) in food : HPLC Method.
7. CANAHUI, E. M.; DARY, O.; DE LEÓN, L. Retinol stability of fortified sugar in Guatemala. In: International Vitamin A Consultative Group Meeting, XVII. Guatemala City, 1996. Report of the XVII International Vitamin A Consultative Group Meeting. USA, OMNI, 1996. P. 130.
8. *Codex Alimentarius* - Principios Generales para la Adición de Nutrientes Esenciales a los Alimentos, v. 4, 1994.
9. DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Fortificação do óleo de soja com vitamina A. Conferência realizada no Workshop sobre fortificação de alimentos. Anfiteatro de Convenções do Campus da USP dia 12/04/94, São Paulo.
10. DUTRA de OLIVEIRA, J.E.; DESAI, I.D.; FÁVARO, R.M.D. and FERREIRA, J.E. Effect of heat treatment during cooking on the biological value of vitamin A fortified soybean oil in human. *Internat. J. Food Sci. Nutr.*, 45:203-207, 1994.
11. FÁVARO, R. M. D.; SOUZA, N. V.; BATISTA, S. M.; FERRIANI, M. G. G.; DESAI, I. D.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Vitamin A status of preschool children in Southern, Brazil. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 852-858, 1986.

12. FÁVARO, R.M.D.; FERREIRA, J. F.; DESAI, I.D., DUTRA de OLIVEIRA, J. E. Studies on fortification of refined soybean oil with all-trans retinyl palmitate in Brazil - Stability during cooking and storage. *J. Food Comp. Anal.*, 4:237-244, 1991.
13. FÁVARO, R.M.D.; MIYASSAKA, M.S.; DESAI, I.D., DUTRA de OLIVEIRA, J. E. Evaluation of the effect of heat treatment on the biological value of vitamin A fortified soybean oil. *Nutr. Res.*, 12:1357-1363, 1992.
14. FLORES, H. & ARAÚJO, C.R.C. Liver levels of retinol in unselected necropsy specimens: a prevalence survey of vitamin A deficiency em Recife, Brazil. *Am. J. Clin. Nutr.*, 40:146-152, 1984.
15. FLORES, H.; CAMPOS F. A. C. S.; SILVA, M. B. M. & LINS, M. H. C. B. Enriquecimento de alimentos: presente e futuro. *Bol. SBCTA*, 30 (1):49-55, 1996.
16. FLORES, H.; GUERRA, N. B.; CAVALCANTI, A.C.A.; CAMPOS, F.A.C.S.; AZEVEDO, M.C.N.A.; SILVA, M.B.M. Bioavailability of vitamin A in synthetic rice premix. *J. Food Sci.*, 59:371-372, 1994.
17. GASSIN, A.L. Aspects réglementaires de L'enrichissement en France et en Europe. *Cah. Nutr. Diét.*, XXVI (1):85-87, 1991.
18. HALEN, B.; JOHNSSON, H.; MAIMBORG, A von; NYMAN, A. & THORZELL, K. Vitamin A and D supplemented in milk products. *Var Föda*, 41 (1/2): 27-31, 1989.
19. OLSON, J. A. Upper limits of vitamin A in infant formulas, with some comments on vitamin K. *J. Nutr.*, 119:1820-1824, 1989.
20. RECOMENDED DIETARY ALLOWANCES. National Research Council. Washington, D.C., 1974.
21. RECOMENDED DIETARY ALLOWANCES. National Research Council. Washington, D.C., 1989.
22. RONCADA, M. J.; WILSON, D.; ORANI, E. T.; AMINOS, S. Prevalência da hipovitaminose A em pré-escolares de município de área metropolitana de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, 18:218-224, 1984.
23. SANTOS, L. M. P.; DRICOT, J. M.; ASCIUTI, L. S.; BENIGNA, M. J. C. N.; DRICOT, C. A. Estudo epidemiológico de xerofthalmia no Estado da Paraíba. *Rev. Bras. Med.*, 40, 419-425, 1983.
24. WALTER, P. Vitamin requirements and vitamin enrichment of foods. *Food Chemistry*, 49:113-117, 1994.
25. WATER, P. Quality control of food fortification. *Nutriview, A Quartely Update on Micronutrients, Nutrition and Health*, Basel, Switzerland, Issue 4, 1995, p. 5.
26. WHO. 1982. Control of vitamin A deficiency and xerophthalmia. *Technical Report Series no. 672*.
27. WILSON, D. and SILVA NERY, M.E. Hypovitaminosis A in Rio Grande do Sul, Brazil. Preliminary Study. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* (suppl. 24): 35-44, 1983.

Recebido para publicação em 10/06/97

AVALIAÇÃO, SEGUNDO DETERMINAÇÕES DE IMPUREZAS, FRAUDES E MATÉRIAS ESTRANHAS, DO CAFÉ TORRADO E MOÍDO PRODUZIDO E/OU COMERCIALIZADO NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SÃO PAULO*

Rejane Alexandre Silva GRACIANO ¹
Aparecida Klai RIBEIRO ¹
Tereza Cristina Castilho GORAYEB ²
Marlene CORREIA ³

RIALA 6/826

GRACIANO, R.A.S.; RIBEIRO, A.K.; GORAYEB, T.C.C.; CORREIA, M. - Avaliação, segundo determinações de impurezas, fraudes e matérias estranhas, do café torrado e moído produzido e/ou comercializado na região de São José do Rio Preto - São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57 (1): 49-55, 1998.

RESUMO: Foram colhidas 121 amostras de café torrado e moído, de 21 marcas, no período de setembro/96 a março/97, em estabelecimentos industriais e comerciais da Região de São José do Rio Preto/SP. As amostras foram analisadas para: a) determinação e quantificação de impurezas (cascas e paus), utilizando o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz; b) identificação de elementos histológicos estranhos (fraudes) realizada pelo método descrito na Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz e através do método de descoramento e hidrólise alcalina e c) determinação de matérias estranhas pelo método descrito na Association of Official Analytical Chemists - 1995. Os resultados mostraram que 79,3% das amostras estavam em desacordo com a legislação de alimentos vigente, sendo que 60,3% continham matérias estranhas, 18,2% apresentaram simultaneamente matérias estranhas e impurezas > 1% e 0,8% impurezas > 1% (acima do limite tolerado). Quanto a matérias estranhas, fragmento de inseto foi a mais detectada, com o maior percentual de amostras (33,8%) apresentando até 5 fragmentos e valor máximo encontrado de 69 fragmentos. Para impurezas, o valor máximo detectado foi de 7%. Em relação a fraudes, o método proposto de clareamento e hidrólise alcalina da amostra mostrou-se mais eficiente que a peneiração atualmente utilizada. Na análise dos rótulos das embalagens de café, 14 das 21 marcas colhidas apresentaram os dizeres obrigatórios definidos na legislação, porém em 2 delas constavam 2 números de registro no Ministério da Saúde; 4 marcas não apresentaram data de fabricação/prazo de validade e/ou a expressão "Indústria Brasileira" e 1 marca não continha o número de registro.

DESCRITORES: Café; impurezas; fraudes; matérias estranhas; análise microscópica.

INTRODUÇÃO

O café torrado e moído é o produto resultante do processamento das sementes da baga do café, que devem, inicialmente, sofrer um beneficiamento para retirada dos elementos vegetais constituintes do pericarpo ou "casca"

(epicarpo, mesocarpo e endocarpo da baga), de parte do espermoderma (ou película) que envolve o endosperma, além do pedúnculo ("paus")^{9,10}, sendo as espécies de café mais cultivadas em nosso País a *Coffea arabica* L. (café arábico) e a *Coffea canephora* PIERRE e FROEHNER (café robusto)⁸.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, Lab. I - São José do Rio Preto.

1. Do Instituto Adolfo Lutz, Lab. I - São José do Rio Preto.

2. Bolsista PAP/SES/FUNDAP, Lab. I - São José do Rio Preto.

3. Do Instituto Adolfo Lutz, Lab. Central/SP.

A legislação de alimentos em vigor ^{5,13} determina que o café torrado e moído não pode apresentar parasitos, larvas e substâncias estranhas e estabelece um nível de tolerância de 1% para impurezas, consideradas como tais as cascas e paus, por serem elementos do próprio vegetal.

Matérias estranhas de origem biológica, como insetos, ácaros e pêlos animais podem contaminar os grãos de café no campo, durante o transporte ou no armazenamento, em decorrência de um processamento em condições higiênicas insatisfatórias ou por estocagem do produto de forma inadequada.

Várias são as pragas que atacam o cafeeiro, desde a raiz ao fruto, como os insetos das espécies *Hypothenemus hampei*, *Perileucoptera coffeella*, *Lonomia circumstans*, *Coccus viridis*, *Saissetia coffeae*, *Planococcus citri*, *Pinnaspis aspidistrae*, *Dysmicoccus cryptus*, *Cerococcus catenarius*, *Quesada gigas*, *Fidicina pronoe*, *Carineta spoliata*, *Carineta fasciculata*, *Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata*. Entre os ácaros destacam-se o *Oligonychus ilicis* e *Polyphagotarsonemus latus* ^{7,20}.

Além das pragas da lavoura, o café armazenado poderá sofrer infestação pelos insetos *Araecerus fasciculatus* e *Coreyra cephalonica*, sendo a ocorrência deste último favorecida pela presença de cereais, como milho e trigo, nos depósitos de café ⁷.

A presença de pêlos animais no alimento indica o contato do mesmo com mamíferos, principalmente roedores, ou com seus excrementos, podendo transmitir bactérias fecais e desse modo contaminá-lo ^{15,16}.

Outras matérias estranhas, como terra e areia, quando presentes no café torrado e moído, alteram a sua qualidade, além de torná-lo em desacordo com a legislação.

A presença de elementos histológicos de outros vegetais, como os cereais, e outros elementos estranhos é caracterizado como fraude no café torrado e moído. Pela metodologia atualmente utilizada ^{9,14}, a detecção de fraudes no café torrado e moído, é realizada juntamente com a determinação de impurezas, no material retido na peneira, após o desengorduramento da amostra. No entanto, é possível que elementos histológicos vegetais (como os amidos) passem pela peneira, não sendo computados no resultado.

Estudos anteriores ^{1,9,12} indicam como principais contaminantes do produto, cascas e paus acima do limite permitido pela legislação, embora também sejam frequentes a presença de milho e cacau torrados, terra, areia e café esgotado. Matérias estranhas, como fragmentos de inseto, ácaros e pêlos de roedor, também foram encontrados em amostras de café ¹⁸.

Assim, o presente estudo foi efetuado com os objetivos de: propor uma metodologia para detecção de fraudes, verificar as condições de pureza e higiene do café torrado e moído quanto à análise microscópica, obter subsídios para propostas de possíveis alterações na legislação de

alimentos em vigor e verificar as embalagens quanto aos dizeres de rotulagem.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem

Foram analisadas 121 amostras de café torrado e moído produzido e/ou comercializado na Região de São José do Rio Preto - SP, colhidas no período de setembro/96 a março/97, pelos Grupos Técnicos de Vigilância Sanitária pertencentes à Direção Regional de Saúde de São José do Rio Preto (DIR-XXII) e em supermercados da mesma Cidade.

As 121 amostras estavam distribuídas em 21 marcas originárias de 16 Torrefações e Moagens de café, situadas no Estado de São Paulo a Noroeste (Cidades de Mirassol, Fernandópolis, São José do Rio Preto, Jales, Santa Fé do Sul, Santa Albertina e Estrela D'Oeste), Sudeste (Cidade de São Paulo e Município de Barueri) e Leste (Cidade de São João da Boa Vista) e 1 Torrefação situada no Estado de Minas Gerais (Cidade de Varginha).

2. Métodos

As amostras de café torrado e moído foram analisadas, em duplicata, no Laboratório de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, Lab. I de São José do Rio Preto, quanto aos seguintes parâmetros:

2.1. Impurezas (cascas e paus)

Para a determinação da quantidade de impurezas (cascas e paus) nas amostras de café, utilizou-se o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz ¹⁴.

2.2. Elementos histológicos estranhos (fraudes)

A identificação dos elementos histológicos estranhos ao produto (fraudes) foi realizada segundo:

- Método (A): descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz ¹⁴,
- Método (B): adotando-se os princípios utilizados em microscopia de alimentos ^{11,17,19} sendo proposta a seguinte metodologia analítica:
 - Homogeneizar a amostra de café e pesar 5g em béquer de 250ml;
 - Adicionar 150ml de solução de hipoclorito de sódio a 2%, misturar e deixar a amostra clarear por cerca de 10min;
 - Filtrar a vácuo sobre papel de filtro;
 - Retirar pequenas porções do material filtrado, preparar lâminas com água filtrada e com lugol e examinar ao microscópio óptico;

- Se necessário, transferir o material do papel de filtro (ou pesar 5g da amostra inicial) para bécquer de 400ml, adicionar 200ml de solução de hidróxido de sódio a 5% e levar à chapa aquecedora até a fervura.
- Filtrar como descrito, preparar lâminas utilizando água filtrada e examinar ao microscópio óptico.

2.3. Matérias estranhas

Para o isolamento das matérias estranhas presentes nas amostras foi utilizado o método da AOAC -1995 (Association of Official Analytical Chemists) ².

2.4. Rotulagem

A análise dos rótulos das embalagens de café foi realizada segundo a legislação pertinente ^{4,5,6,13}, quanto aos seguintes dizeres obrigatórios: designação, conteúdo, composição do produto, número de registro no órgão competente do Ministério da Saúde, data de fabricação/prazo de validade, dados do fabricante ou produtor, sede da fábrica ou local de produção e a expressão "Indústria Brasileira".

3. Análise estatística

Para verificar se havia correlação entre os resultados obtidos, quanto à presença de matérias estranhas e impurezas, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson ³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 é apresentado o número de amostras colhidas e analisadas, por marca de café, designadas de A a U.

Marca	Nº de amostras	Marca	Nº de amostras
A	4	L	6
B	4	M	4
C	4	N	4
D	4	O	4
E	10	P	2
F	8	Q	4
G	6	R	8
H	7	S	7
I	5	T	8
J	8	U	3
K	11		

Quadro 1. Número de amostras colhidas quanto às marcas de café torrado e moído. São José do Rio Preto, 1996/97.

Em função das variações que ocorrem quanto à comercialização e distribuição das diferentes marcas de café, não foi colhido o mesmo número de amostras para todas as marcas; neste estudo a média de amostras/marca foi de 5,7.

Na Figura 1 são apresentados os percentuais de amostras de café torrado e moído contendo impurezas (cascas e paus). Observa-se que 81% das amostras estavam de acordo com a legislação de alimentos, pois apresentavam no máximo 1% de cascas e paus de café. Detectou-se, ainda, 5% das amostras com elevado teor de impurezas (5-7%), indicando não ter havido um beneficiamento adequado do grão de café antes da moagem.

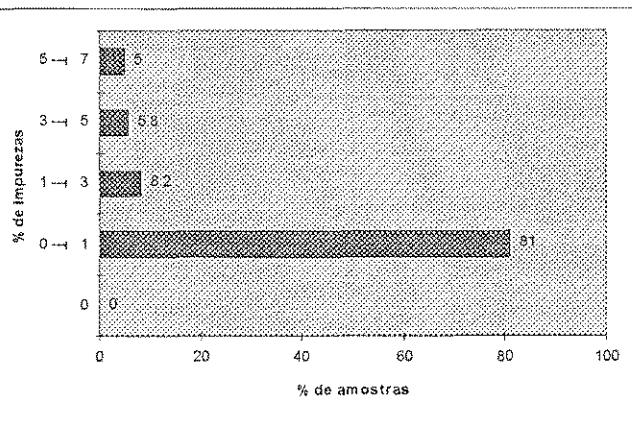
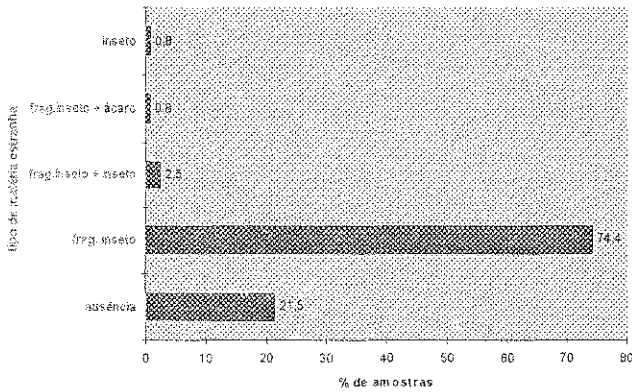


Figura 1. Percentual de amostras de café torrado e moído contendo impurezas (cascas e paus). São José do Rio Preto, 1996/97.

Em relação a fraudes, o método de tratamento da amostra com solução de hipoclorito de sódio a 2% clareou adequadamente os fragmentos vegetais, em amostras-teste de café torrado e moído adulterado com cereais, facilitando a identificação dos elementos histológicos ao microscópio óptico. A montagem de lâminas com o material clareado e lugol auxiliou na detecção de amidos estranhos, uma vez que, ao torrar o grão de café, o amido sofre alterações em sua estrutura, o que dificulta a sua observação. A utilização da solução de hidróxido de sódio a 2% quente hidrolizou o amido da amostra, permitindo a montagem de lâminas com maior quantidade de elementos histológicos vegetais, facilitando a detecção de fraudes.

Das 121 amostras analisadas pelos dois métodos, no método A encontrou-se 3 amostras fraudadas (2,4%) por elementos histológicos de milho; enquanto pelo método B, detectou-se 10 amostras fraudadas (8,3%), sendo 6 amostras com milho e mandioca, 3 com milho e 1 com trigo e mandioca. Desta forma, o método proposto (método B) utilizando a amostra integral, sem separação por peneira, mostrou-se mais preciso e eficiente.

Quanto ao parâmetro matérias estranhas, apenas 21,5% das amostras estavam isentas das mesmas; nas demais detectou-se, principalmente, fragmentos de insetos e, em percentual bem menor, outras matérias estranhas biológicas, como insetos e ácaros, concomitantes ou não com os fragmentos de insetos, conforme observa-se na Figura 2.



frag = fragmento

Figura 2. Percentuais de amostras de café torrado e moído, quanto aos tipos de matérias estranhas. São José do Rio Preto, 1996/97.

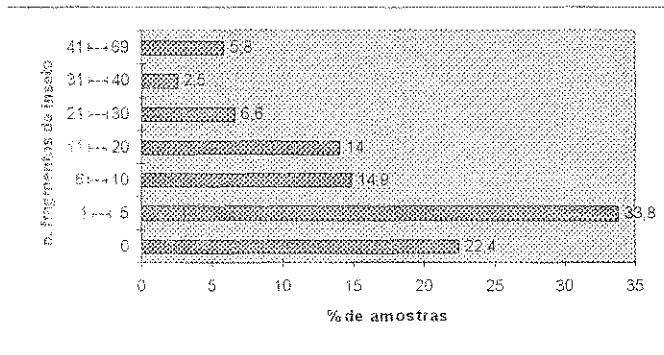


Figura 3. Percentual de amostras de café torrado e moído, quanto a fragmentos de insetos. São José do Rio Preto, 1996/97.

Como os fragmentos de insetos foram a matéria estranha presente em maior número de amostras de café (Figura 2), são apresentados na Figura 3 os percentuais de amostras e os intervalos para fragmentos de insetos. Observa-se que o maior percentual de amostras positivas está na faixa de 1 a 5 fragmentos (33,8%), com frequência

acumulada de 56,2% para até 5 fragmentos de insetos/25g de amostra. No entanto, foram encontradas amostras com até 69 fragmentos, indicando não haver uma preocupação quanto à aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) na elaboração desse produto alimentício, que embora passe por um processo de filtração antes do consumo, deve apresentar-se em condições sanitárias adequadas.

As 21 marcas de café analisadas apresentaram pelo menos uma de suas amostras contendo matérias estranhas.

Como a legislação de alimentos estabelece um limite de tolerância de 1% para cascas e paus de café e determina que deve haver ausência de parasitos, larvas e substâncias estranhas no café torrado e moído, observa-se pela Tabela que o maior percentual de amostras em desacordo com a legislação continha matérias estranhas, porém, apresentava impurezas dentro do limite tolerado (60,3%). No entanto, praticamente não houve correlação (coeficiente de correlação = - 0,1) entre esses dois parâmetros (Figura 4).

Ainda de acordo com a Tabela, praticamente todas as amostras contendo impurezas >1% também apresentavam matérias estranhas. Nas 22 amostras contendo simultaneamente impurezas acima do limite tolerado e matérias estranhas, encontrou-se uma fraca correlação negativa (coeficiente de correlação = - 0,3) entre condições sanitárias inadequadas do produto (matérias estranhas) e mau beneficiamento do grão (impurezas) (Figura 5). De um modo geral, estas amostras apresentaram menor número de matérias estranhas, quando comparadas àquelas relacionadas na Figura 4.

Na análise dos rótulos das embalagens de café, das 21 marcas colhidas, 14 (66,6%) apresentavam todos os dizeres exigidos pela legislação; 2 continham, também, o item "ingredientes" e 1 marca apresentou o número de lote.

Em desacordo com a legislação estavam 7 marcas: 1 que, embora apresentando todos os dizeres exigidos pela legislação, continham dois números de registro diferentes no Ministério da Saúde, 1 com dois números de registro e sem data de fabricação, 1 marca sem número de registro e sem data de fabricação/prazo de va-

TABELA

Percentual de amostras de café torrado e moído, no que se refere à Legislação de alimentos. São José do Rio Preto, 1996/97.

Legislação	Tipos de contaminantes	Amostras	
		FA	%
De acordo		25	20,7
Sub total		25	20,7
Em desacordo	Matéria estranha + impureza < 1%	73	60,3
	Matéria estranha + impureza > 1%	22	18,2
	Impureza > 1%	1	0,8
Sub total		96	79,3
Total		121	100,0

FA: frequência absoluta

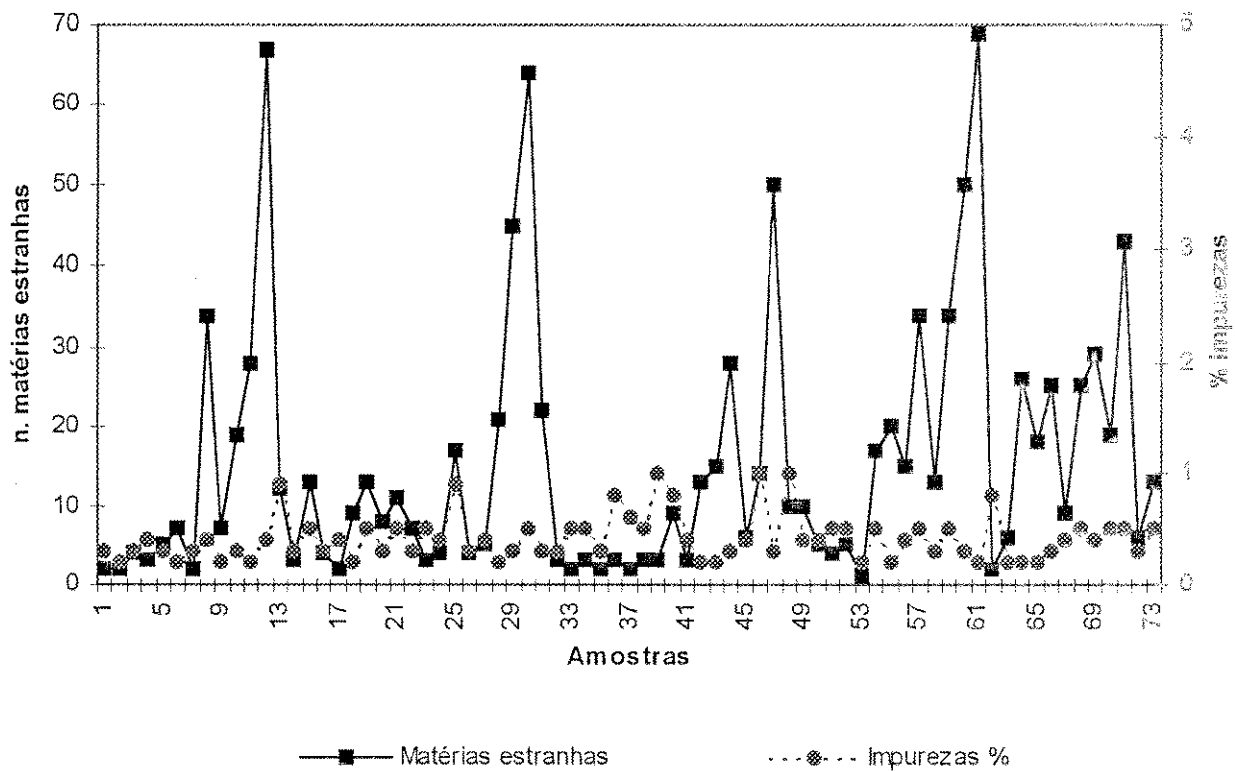


Figura 4. Amostras contendo matérias estranhas e impurezas < 1%, em desacordo com a Legislação de alimentos vigente. São José do Rio Preto, 1996/97.

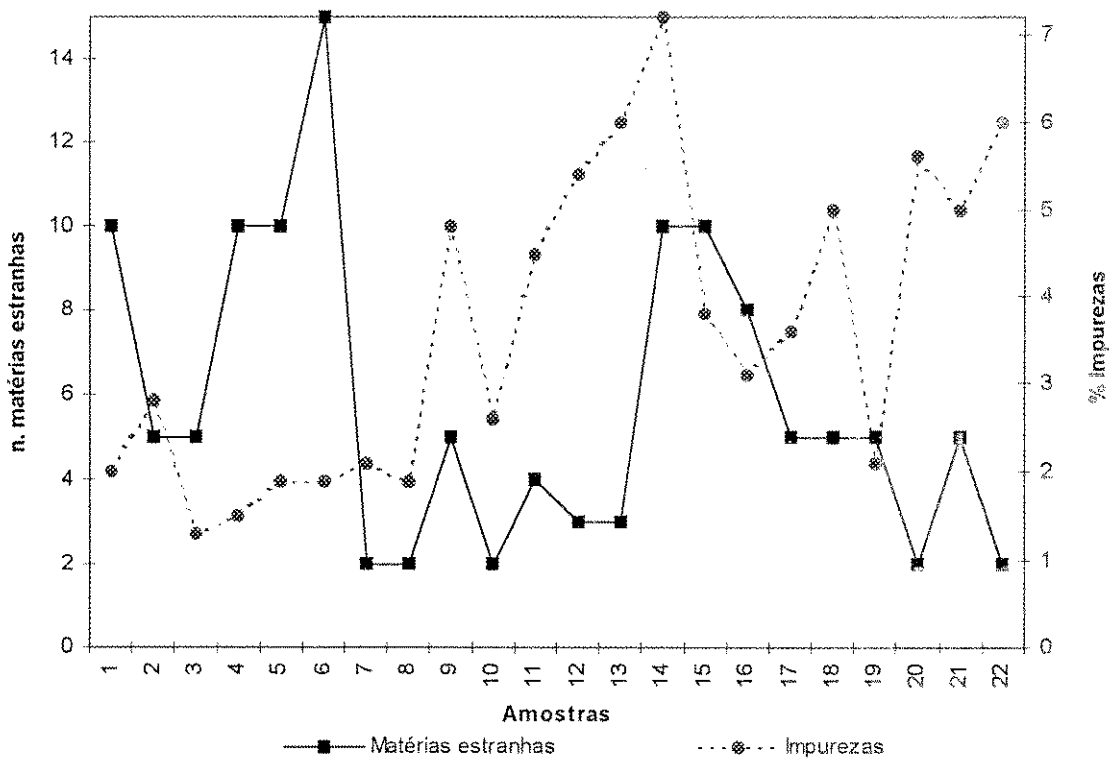


Figura 5. Amostras contendo matérias estranhas e impurezas > 1%, em desacordo com a Legislação de alimentos vigente. São José do Rio Preto, 1996/97.

lidade e 4 marcas que não apresentavam data de fabricação/prazo de validade e/ou a expressão "Indústria Brasileira".

Quanto às informações úteis, como modo de preparo, modo de conservação do produto e serviço de atendimento ao consumidor, apenas 1 marca apresentou estas três informações no rótulo, enquanto 11 marcas exibiam pelo menos uma delas. Como 9 marcas não fizeram menção a qualquer um dos três itens mencionados, nota-se a fragilidade de tais informações para orientar o consumidor.

Cabe ressaltar que, das marcas que apresentavam o número de telefone para eventuais consultas do consumidor, menos da metade oferecia "ligação gratuita".

CONCLUSÃO

O método proposto para detecção de fraudes mostrou-se adequado, sendo mais eficiente, preciso e rápido que o tradicionalmente utilizado.

Em razão do elevado percentual de amostras contendo impurezas dentro do limite tolerado pela legislação mas apresentando matérias estranhas, torna-se importante a realização da análise microscópica completa em amostras de café torrado e moído, ou seja, análise histológica e de matérias estranhas, além de indicar a necessidade de um melhor controle de qualidade quanto às condições sanitárias do produto.

Devido ao alto índice de amostras contendo fragmentos de insetos, necessita-se de uma revisão da Resolução 12/78 e do Decreto 12.486/78, com o estabelecimento de níveis de tolerância para essa matéria estranha, a partir de estudos realizados no País, devendo continuar com ausência para as demais matérias estranhas.

Na rotulagem, os itens exigidos pela legislação não foram totalmente cumpridos, não havendo, também, uma preocupação em melhor orientar o consumidor com informações como modo de preparo, conservação e atendimento ao consumidor.

RIALA 6/826

GRACIANO, R.A.S.; RIBEIRO, A.K.; GORAYEB, T.C.C.; CORREIA, M. - Valuation, according to determination of impurity, fraud and extraneous materials, toasted and ground coffee produced and/or traded in area of São José do Rio Preto-São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 49-55, 1998.

ABSTRACT: 121 samples of ground and toasted coffee have been collected, from 21 brands, during September 1996 through March 1997, in industrial and commercial houses in area of São José do Rio Preto/SP. Samples were analysed for: a) determination and qualification of impurity (sticks and peels), for which method described in Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz has been used; b) fraud through method of bleaching and alkaline hydrolysis and c) determination of light filth through mentioned method in Association of Official Analytical Chemists-1995. Results showed that 79,3% samples were in disagreement with present bromatologic legislation, being 60,3% samples for containing extraneous materials, 18,2% samples for containing simultaneously extraneous materials and impurity > 1% and 0,8% samples for impurities > 1% (over limit admitted). As too extraneous materials, insect fragment was the one most detect, mostly samples (33,8%) contained between 1 to 5 fragments and maximum amount found of 69 insect fragments, while to impurities was 7%. In the analyses of labels of coffee, 14 from brands collected carried obligatory saying defined by legislation, however 2 of them carried two registration numbers of the Health Ministry, 4 brands didn't present date of manufacture/term of validity and/or expression "Indústria Brasileira" and 1 didn't show number of registration.

DESCRIPTORS: Coffee; impurities; frauds; light filth.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, G.; CAMPOS, C.M.T.; MORETTO, E.; PHILIPPI, J.M.S.; ARCHER, R.M.B.; GOULART, R.; 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. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. - *Official methods of analysis*, 16^o ed. Washington, DC., 1995, p. 7.
3. BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P. & GOTLIEB, S.L.D. - *Bioestatística*, São Paulo, EPU, 1981, p.98-106.
4. BRASIL. Leis, etc. - Decreto n^o 986 de 21 de outubro de 1969. *Diário Oficial*, Brasília, Ministério da Saúde, 21 out. 1969, Seção I, p. 8935.
5. BRASIL. Leis, etc. - Resolução n^o 12/78. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978, Seção I, pt. 1, p. 11509.

- Aprova Normas Técnicas Especiais relativas a alimentos e bebidas.
6. BRASIL. Leis, etc. - Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990. *Diário Oficial*, Brasília, 12 set. 1990, Seção I. Dispõe sobre a proteção do Consumidor e dá outras providências.
 7. GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA, N.S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. - *Manual de entomologia agrícola*, 2º ed. São Paulo, Ceres, 1988, 348-58.
 8. JARDINI, J.G. - Redução da viscosidade de extrato de café por processo enzimático. 1991. [Tese de Doutorado - Fac. de Engenharia de Alimentos, UNICAMP].
 9. LOPES, F.C. - Determinação de sedimento, cascas e paus no café torrado e moído. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 29-34, 1974.
 10. MENEZES JR, J.B.F. - Sobre um método microscópico para contagem de cascas no café em pó. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 11: 13-47, 1951.
 11. MENEZES JR, J.B.F. - Fraudes do café. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 12: 111-144, 1952.
 12. 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: 113-17, 1996.
 13. SÃO PAULO. (Estado). Leis, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978, p. 1. (NTA- 44). Aprova Normas Técnicas Especiais relativas a alimentos e bebidas.
 14. SÃO PAULO - Instituto Adolfo Lutz - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. vol. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3º ed. São Paulo, 1985, p. 193-5.
 15. STASNY, J.T. et al. - Identification of foreign matter in foods. *Scan. Electron. Microsc.*, 3: 599-610, 1981.
 16. VAZQUEZ, A.W. - Structure and identification of common food-contaminating hairs. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 44: 754-79, 1961.
 17. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N.; RODRIGUES, R.M.M.S.; JORGE, L.I.F.; ATUI, M.B.; PEREIRA, U.; SANTOS, M.C. - Manual de análise microscópica de alimentos, São Paulo, 1986, 80 p. [Mimeografado].
 18. ZAMBONI, C.Q.; SPITERI, N. & LOPEZ, F.C. - Matérias estranhas e fraudes em café torrado e moído. *Resumos*, VII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, São Paulo, 1991, p.37.
 19. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; JORGE, L.I.F.; ATUI, M.B.; NOGUEIRA, M.D.; CORREIA, M.; SPITERI, N.; RODRIGUES, R.M.M.S. - Métodos de análise microscópica de alimentos. Parte I: Isolamento de elementos histológicos. Em publicação.
 20. ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S. & NAKANO, O. - *Guia de identificação de pragas agrícolas*, Piracicaba, FEALQ, 1993, p. 9.

Recebido para publicação em 14/08/97

EFEITO DO PROCESSAMENTO DO MILHO EM GRÃO NO NÍVEL DE MATÉRIAS ESTRANHAS ENCONTRADAS NO GRITS E FUBÁ*

Márcia Bittar ATUI **
Flávio Antônio LÁZZARI ***
Claydes de Quadros ZAMBONI**

RIALA 6/827

ATUI, M.A.; LÁZZARI, F.A.; ZAMBONI, C.Q. - Efeito do processamento do milho em grão no nível de matérias estranhas encontradas no grits e fubá. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(1): 57-63, 1998.

RESUMO: A segurança dos alimentos é de importância estratégica para a saúde da população e para a economia do País. Neste trabalho avaliou-se a presença de matérias estranhas no milho em grão e após o seu processamento em grits e fubá. Foram analisadas 81 amostras de milho em grão, 81 de grits e 81 de fubá, fornecidas pela indústria, de acordo com a produção diária, durante um período de 4 meses. As análises basearam-se nos métodos descritos na AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 16ª edição -1995, com modificações e no Manual de Análise Microscópica de Alimentos (ZAMBONI et alii, 1986). Das 81 amostras de milho em grão, analisadas pelo método da peneiração, 29,6% apresentaram insetos vivos, 28,4% insetos mortos e 72,8% partículas metálicas. Pelo método da infestação interna, 79,0% das amostras apresentaram larvas inteiras, 43,2% cabeças de larvas, 37,0% cabeças de insetos e 27,2% insetos inteiros. Das amostras de grits, analisadas pelo método da flutuação, 76,5% apresentaram fragmentos de insetos enquanto que as mesmas amostras, analisadas pelo método da peneiração, apresentaram a predominância em 81,5% de partículas metálicas. Observou-se uma alta contaminação do fubá por larvas (75,3%). Devido ao número de fragmentos de insetos e à presença de larvas mortas, pupas, insetos mortos, ácaros e pêlos de animal não identificado, 79% das amostras de fubá estavam em desacordo com a legislação em vigor. Ocorreu um aumento nos níveis de matérias estranhas no grits e fubá a partir do grão de milho infestado.

DESCRITORES: matérias estranhas, milho, grits e fubá.

INTRODUÇÃO

A manutenção da quantidade e da qualidade dos grãos de milho é muito dependente do tratamento dado aos mesmos na colheita e, principalmente, na pós-colheita. As condições climáticas durante a colheita, a demora em colher, a regulagem e velocidade da colhedeira e as técnicas de recebimento, secagem, limpeza e armazenamento são de importância fundamental para a manutenção da qualidade física, sanitária e nutricional do cereal¹⁰.

As condições de armazenamento, geralmente inadequadas, oferecem aos insetos, fungos e ácaros, tanto alimento como temperatura e umidade favoráveis ao seu desenvolvimento. A atividade metabólica destes organismos causa au-

mento da temperatura na massa de grãos, umidecimento do produto e condensação nas superfícies, podendo levar a contaminação e/ou deterioração do produto^{8,10}.

As matérias estranhas encontradas no milho e seus produtos são originadas, principalmente, devido a falhas nas práticas de estocagem do produto e de manipulação e, na maioria das vezes, pelas condições sanitárias ou higiênicas insatisfatórias da indústria¹⁶.

As condições deficientes de armazenamento, processamento e manuseio permitem que os produtos apresentem insetos, fragmentos de insetos, ácaros, excrementos, fungos, pêlos, urina de roedor e outros contaminantes. Os insetos, ácaros e fungos contaminam e consomem o produto provocando alterações e/ou degradação no perfil físico, sanitário e nutricional do mesmo¹⁰.

* Da Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas - Área de Entomologia, apresentada à Universidade Federal do Paraná-PR

** Instituto Adolfo Lutz-SP

*** Universidade Federal do Paraná-Curitiba-PR

Segundo a AOAC (Association of Official Analytical Chemists - 1995)¹, matérias estranhas podem estar presentes nos alimentos, devido a ocorrências anormais ou condições e práticas inadequadas durante as fases de produção, armazenamento e distribuição. São consideradas matérias estranhas: insetos, ácaros, pêlos de roedores, penas de aves, excrementos de roedores e de aves, entre outros, material em decomposição (tecidos vegetais em deterioração por ação de parasitas ou outros) e materiais diversos (arcia, terra, vidro, metal), excluída a contaminação bacteriana.

Conforme a Food and Agricultural Organization (FAO) citada por GALLO et alii⁹, as perdas de grãos causadas por insetos são estimadas em 10% da produção mundial. No Brasil, estas perdas podem variar de 0 a 30%, dependendo do tipo de armazenamento. As perdas maiores são encontradas à nível de propriedade rural, pois as condições de armazenamento são precárias, dificultando as medidas de controle.

Uma grande variedade de contaminantes pode atacar e infestar os alimentos "in natura" durante a fase final de maturação no campo, colheita, armazenamento e no processamento, afetando a qualidade e causando perdas por rejeição e/ou condenação do produto final. Qualquer área onde o alimento é armazenado ou processado é susceptível a infestação. O meio ambiente, as instalações, o complexo maquinário para o processamento e transporte de alimentos e a expedição favorecem o abrigo de diferentes espécies de contaminantes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processamento do milho em grão no nível de matérias estranhas encontradas no grits e fubá.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - AMOSTRAGEM DO MILHO EM GRÃO, GRITS E FUBÁ

Foram analisadas 81 amostras de milho em grão, 81 de grits e 81 de fubá provenientes de uma indústria no estado do Paraná, no período de 24 de agosto a 17 de dezembro de 1994. Uma amostra de 500 gramas foi retirada do lote de milho em grão que se destinou a moagem a seco e as amostras de grits e fubá foram originadas deste mesmo lote de milho. As amostras de milho em grão, grits e fubá foram embaladas em sacos plásticos, etiquetadas, datadas e remetidas quinzenalmente para a Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, para análise.

A amostra foi espalhada em papel manilha e homogeneizada. A amostra de trabalho foi retirada ao acaso, com o auxílio de uma colher, de vários pontos da amostra original.

2 - MÉTODOS

MILHO EM GRÃO

Isolamento de matérias estranhas

A pesquisa de matérias estranhas externas nos grãos baseou-se no método da peneiração, descrito no Manual de Análise Microscópica de Alimentos¹⁷.

Pesquisa de infestação interna

A pesquisa da infestação interna foi realizada pelo método da flutuação nº 16.5.04, descrito na AOAC - 1995¹, com as seguintes modificações:

- homogeneização manual da amostra;
- peneiração da amostra em peneira nº 12 (1,68mm);
- moagem do milho e verificação do tamanho através da peneira nº 16 (1,19mm);
- utilização de 20 ml de heptano;
- agitação manual por 20';
- filtração em funil de Buchner, utilizando papel de filtro riscado com linhas paralelas;
- lavagem do béquer contendo líquido extrator, com água filtrada e álcool isopropílico à 60%, alternadamente;
- clareamento, quando necessário, do material retido no papel de filtro, com solução de hipoclorito de sódio à 2%¹⁸.

GRITS

Isolamento de matérias estranhas

A pesquisa de matérias estranhas externas baseou-se no método da peneiração, descrito no Manual de Análise Microscópica de Alimentos¹⁷.

Pesquisa de sujidades leves

A pesquisa de sujidades leves foi realizada segundo o método nº 16.5.08 B, descrito na AOAC - 1995¹, com as seguintes modificações:

- pesagem da amostra (50g) diretamente no frasco armadilha de Wildman de 2000ml;
- lavagem do béquer contendo líquido extrator com água filtrada e álcool isopropílico à 60%, alternadamente.

FUBÁ

Pesquisa de matérias estranhas

A pesquisa de matérias estranhas em fubá foi realizada segundo método da flutuação no 16.5.15 B, descrito na AOAC - 1995¹, com as seguintes modificações:

- lavagem do frasco extrator com álcool etílico ou absoluto e água filtrada, alternadamente;
- filtração em funil de Buchner;
- lavagem do béquer contendo líquido extrator, com

álcool etílico ou absoluto e água filtrada alternadamente;

- clareamento, quando necessário, do material retido no papel de filtro, com solução de hipoclorito de sódio à 2%¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As matérias estranhas externas isoladas pelo método da peneiração (ZAMBONI et alii)¹⁷ em milho em grão estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Quantidade e porcentagem (%) de amostras com matérias estranhas externas, em 81 amostras de milho em grão, analisadas pelo método da peneiração.

Tipos de matérias estranhas	AMOSTRAS	
	Quantidade	%
Ovos de insetos	6	7,4
Larvas de insetos vivas	8	9,9
Larvas de insetos mortas	14	17,3
Pupas de insetos	7	8,6
Insetos vivos	24	29,6
Insetos mortos	23	28,4
Fragmentos de insetos	23	28,4
Ácaros vivos	1	1,2
Ácaros mortos	1	1,2
Pêlos de roedores	1	1,2
Pêlos de gato	1	1,2
Dejeções de insetos	80	98,8
Partículas metálicas	59	72,8

Os valores acima são o resultado de 1 (uma) repetição.

Pela Tabela 1 observa-se que das 81 amostras analisadas, 98,8% continham dejeções de insetos; 72,8% partículas metálicas; 29,6% insetos vivos; 28,4% insetos mortos; 28,4% fragmentos de insetos; 17,3% larvas mortas; 9,9% larvas vivas; 2,4% ácaros vivos ou mortos e 2,4% pêlos de roedor ou de gato. A presença de ovos, larvas, pupas, insetos e dejeções indica que o milho estava infestado e que haviam insetos alimentando-se e completando o seu ciclo evolutivo neste produto.

O ecossistema formado por uma massa de grãos armazenados oferece condições favoráveis ao desenvolvimento de insetos, ácaros e fungos. Os danos causados pelos insetos incluem perdas quantitativas, representadas pelo consumo de matéria seca, e qualitativas caracterizadas pela diminuição do valor nutritivo em função da redução de carboidratos, proteínas, vitaminas e teor de óleo, além da contaminação devido à presença de insetos e seus resíduos em grãos e seus produtos¹¹.

Os pássaros e roedores são considerados invasores do ecossistema de grãos armazenados. As perdas diretas causadas pelo consumo dos grãos são pequenas (na ordem

de 1%), porém as perdas indiretas são maiores, incluindo dano na estrutura, contaminação por pêlos, penas, urina, sangue, saliva, fezes e fragmentos de corpo, e propagação de pestes e patógenos¹⁵.

O alto nível de contaminação por partículas metálicas é indicativo do desprendimento deste tipo de matéria estranha dos equipamentos de pré-limpeza, secagem e transporte de grãos. A produção, transporte e processamento de grãos envolvem moagem, peneiração, corte, pulverização, contato com superfícies metálicas, resultando na contaminação dos produtos com partículas metálicas. O ajuste impróprio e a falta de manutenção na maquinaria desde a colheita até o processamento final também pode incorporar partículas metálicas ao alimento^{5,6}.

Os resultados obtidos na análise do milho em grão, pelo método da infestação interna (AOAC - 1995)¹, estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Quantidade e porcentagem (%) de amostras com matérias estranhas, em 81 amostras de milho em grão, analisadas pelo método da infestação interna.

Tipos de matérias estranhas	AMOSTRAS	
	Quantidade	%
Ovos de insetos	1	1,2
Pupas de insetos	10	12,3
Cabeças de larvas de insetos	35	43,2
Larvas de insetos	64	79,0
Cabeças de insetos	30	37,0
Insetos inteiros	22	27,2
Ácaros	4	4,9
Exúvias	7	8,6

Os valores acima são o resultado de 1 (uma) repetição.

Apesar do método determinar a contagem somente de insetos inteiros e/ou equivalentes e exúvias, a observação das outras matérias estranhas também foi importante. Assim, a identificação de ovos e pupas indicou que havia insetos em atividade biológica. Já a contaminação acariana pode ser decorrente do mau armazenamento, do alto nível de umidade dos grãos, da deficiência de circulação de ar, da abrasão dos grãos durante as operações de transilagem, do transporte e ensacamento, do acúmulo de resíduos e da presença de fungos, leveduras e bactérias^{2,8}.

O método da infestação interna permite a verificação de larvas e/ou insetos primários que se encontram dentro do grão. Muitas das amostras de milho analisadas por este método continham larvas e insetos do gênero *Sitophilus* que sendo praga primária interna alimenta-se do conteúdo do grão onde completa o seu ciclo evolutivo, como apontado por GALLO et alii⁹. FOGLIAZZA & PAGANI⁷ e ROSTOM¹² citam os coleópteros como as pragas mais importantes que atacam os produtos armazenados, sendo que SINHA & SINHA¹⁴ encontraram o *Sitophilus oryzae*

L. como espécie dominante entre as pragas de milho armazenado.

Verifica-se pela Tabela 2 que 79,0% das amostras continham larvas inteiras, 43,2% cabeças de larvas, 37,0% cabeças de insetos e 27,2% insetos inteiros. Provavelmente, o método para detecção da infestação interna, que utiliza a moagem do grão, é responsável pelo elevado número de cabeças de larvas e de adultos. A cabeça sendo mais dura tem maior resistência ao dano físico da moagem.

De acordo com o observado nas Tabelas 1 e 2, os dois métodos mostraram o alto grau de infestação externa e interna das amostras de milho em grão por matérias estranhas. A presença de ovos, pupas, larvas, insetos e exúvias, nas amostras de milho em grão indica que havia insetos, que completaram o seu ciclo evolutivo nestes produtos.

Na Tabela 3 pode-se observar as matérias estranhas recuperadas nas amostras de grits pelo método da flutuação (AOAC - 1995)¹ e pelo método da peneiração (ZAMBONI et alii)¹⁷.

O grits é retirado da porção interna do grão de milho, sendo constituído basicamente de endosperma vítreo, sendo assim o processamento do milho leva a uma concentração de matérias estranhas no produto final.

Antes da utilização de métodos específicos para isolamento das matérias estranhas é muito importante que seja feita uma observação da amostra para que se direcione a análise. Pelo princípio de cada método recupera-se determinado tipo de matéria estranha. Quando se quer recuperar organismos vivos, partículas metálicas e dejeções de insetos o método da peneiração é mais adequado, uma vez

que o método da flutuação utiliza solventes que matam os organismos e não isola as partículas metálicas e dejeções de insetos. O método da flutuação é utilizado para recuperação de sujidades leves, que sendo lipofílicas, são isoladas de um sistema contendo óleo e água e, portanto, adequado para recuperação de insetos e fragmentos, larvas e fragmentos, ácaros e pêlos.

Pelo método da flutuação observa-se que, 76,5% das amostras de grits continham fragmentos de insetos, 11,1% larvas mortas e 7,4% fragmentos de larvas.

Pelo método da peneiração observa-se que 81,5% das amostras continham partículas metálicas, 11,1% fragmentos de insetos e 6,2% larvas mortas.

De acordo com observado nas Tabelas 1 e 3 verifica-se que 72,8% das amostras de milho e 81,5% das amostras de grits estavam contaminadas com partículas metálicas, indicando problemas na manutenção dos equipamentos de moagem e peneiração^{5,6}.

A presença de partículas metálicas em milho em grão e grits está de acordo com o estudo realizado por CUNNINGHAM e Ó'BRIEN⁶ que relataram a presença de partículas metálicas em vários tipos de produtos alimentícios.

De acordo com CHATT⁵ as causas mais comuns da contaminação por partículas metálicas são devidas ao desgaste da maquinaria principalmente durante as operações de peneiração, moagem, laminação, ajuste de juntas e ligações e perdas de parafusos. O fato do grits ter que passar por várias peneiras visando sua uniformidade possibilita uma maior contaminação por partículas desprendidas dos equipamentos. (LAZZARI 1996, comunicação pessoal)

TABELA 3 - Comparação da quantidade (nº) e porcentagem (%) de amostras com matérias estranhas em 81 amostras de grits, analisadas por 2 métodos diferentes.

Tipos de matérias estranhas	AMOSTRAS			
	M. Flutuação		M. Peneiração	
	Nº	%	Nº	%
Ovos de insetos	2	2,5	2	2,5
Larvas de insetos vivas	-	-	3	3,7
Larvas de insetos mortas	9	11,1	5	6,2
Pupas de insetos	2	2,5	1	1,2
Insetos vivos	-	-	4	5,0
Insetos mortos	2	2,5	1	1,2
Fragmentos de insetos	62	76,5	9	11,1
Fragmentos de larvas de insetos	6	7,4	1	1,2
Ácaros vivos	-	-	1	1,2
Ácaros mortos	5	6,2	3	3,7
Pêlo de roedor	1	1,2	0	0,0
Pêlos de animal não identificado	-	-	1	1,2
Dejeções de insetos	-	-	4	5,0
Partículas metálicas	7	8,7	66	81,5

Os valores acima são o resultado de 1 (uma) repetição.

Considerando a legislação em vigor para cereais, baseada na Resolução no 12/78³ e no Decreto no 12.486/78¹³ que exige ausência de sujidades, parasitos e larvas em todos os tipos de alimentos, 100% das amostras de milho em grão e 98,8% das amostras de grits estão fora dos padrões de qualidade estabelecidos.

A presente Legislação não é adequada a realidade de produção, armazenamento e processamento de milho, precisando ser revista e atualizada, pois o controle apenas reduz o nível populacional não eliminando totalmente os insetos presentes nos produtos armazenados. Pode-se tolerar certos níveis de matérias estranhas nos alimentos, cabendo a pesquisa estabelecer suas quantidades.

Pelas Tabelas 1 e 3 observa-se que pêlos de roedores só foram isolados de 1 (uma) amostra de milho em grão e de 1 (uma) amostra de grits mostrando um baixo nível de contaminação por esta matéria estranha.

Pela Tabela 1 verifica-se que amostras de milho em grão continham insetos vivos (29,6%) e/ou mortos (28,4%), o que resultou na grande porcentagem de amostras de grits (76,5%) com fragmentos de insetos, conforme observado pela Tabela 3.

As matérias estranhas recuperadas nas amostras de fubá pelo método da hidrólise ácida (AOAC - 1995)¹, estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 - Quantidade e porcentagem (%) de amostras com matérias estranhas, em 81 amostras de fubá, analisadas pelo método da hidrólise ácida.

Tipos de matérias estranhas	AMOSTRAS	
	Quantidade	%
Larvas mortas	61	75,3
Pupas	1	1,2
Insetos mortos	1	1,2
Fragmentos de insetos	80	98,8
Fragmentos de larvas	38	46,9
Ácaros	6	7,4
Pêlos de animal não identificado	1	1,2
Partículas metálicas	2	2,5

Os valores acima são o resultado de 1 (uma) repetição.

De acordo com a Tabela 4, observa-se que 98,8% das amostras continham fragmentos de insetos; 75,3% larvas mortas; 46,9% apresentavam fragmentos de larvas; 7,4% ácaros e 2,5% partículas metálicas.

A Portaria nº 1/1986 do Ministério da Saúde⁴ estabelece o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos, a nível microscópico, em 100g de farinhas e seus derivados. Em relação a outros tipos de matérias estranhas, a mesma Portaria exige ausência total.

Para efeito de rejeição e/ou condenação de lotes de fubá, os fragmentos de larvas foram computados juntamente com os fragmentos de insetos, respeitando-se o limite de 30 fragmentos em 50g do produto.

De acordo com a Portaria nº 1/1986⁴ e como se observa na Tabela 5; 79,0% das amostras estão rejeitadas e/ou condenadas por conter número de fragmentos de insetos acima do limite tolerado e pela presença de larvas mortas, pupas, insetos mortos, ácaros, pêlos de animal não identificado e partículas metálicas.

TABELA 5 - Quantidade e porcentagem (%) de amostras de fubá aprovadas e condenadas, segundo a legislação em vigor (Portaria nº 1/1986).

Amostras	Quantidade	%
Aprovadas	17	21,0
Condenadas	64	79,0
Total	81	100,0

A presença de grande quantidade de amostras de grits e fubá contendo fragmentos de insetos, como observa-se nas Tabelas 3 e 4, indica que o milho em grão estava infestado por pragas e que estes produtos foram manipulados, processados e/ou estocados em condições higiênicas insatisfatórias. Também, atribui-se a grande quantidade de matérias estranhas no fubá a pontos de infestação internos na indústria.

Observou-se que em 100% de amostras de milho em grão, 98,8% de grits e 100% de fubá foram encontrados pelo menos um tipo de matéria estranha.

Ocorreu um aumento nos níveis de matérias estranhas no grits e fubá a partir do grão de milho infestado.

CONCLUSÕES

MILHO EM GRÃO

• A presença de insetos vivos e larvas vivas recuperadas pelo método da peneiração indica que o milho em grão estava infestado, que o controle dos insetos não foi eficiente ou que pode ter ocorrido uma reinfestação do produto durante o armazenamento.

• A presença de insetos mortos e larvas mortas e de outras matérias estranhas no milho em grão indica problemas na limpeza do cereal.

• A grande porcentagem de amostras contendo insetos inteiros, cabeças de insetos, larvas inteiras e cabeças de larvas recuperadas pelo método da infestação interna, indica que o milho continha larvas e insetos primários dentro dos grãos.

• A presença de ovos, pupas, larvas, insetos e exúvias nas amostras de milho em grão indica que havia insetos em atividade biológica, completando o seu ciclo evolutivo neste produto.

• As dejeções de insetos recuperadas pelo método da peneiração foram as matérias estranhas em maior porcentagem.

tagem nas amostras de milho em grão, indicando que o milho foi previamente infestado.

· As matérias estranhas mais freqüentes na parte externa do grão de milho foram dejeções de insetos e partículas metálicas, enquanto que na parte interna foram as larvas inteiras.

· O método da peneiração é o adequado para detecção de infestação viva, partículas metálicas e dejeções de insetos.

GRITS

· A presença de ovos, larvas, pupas e insetos nas amostras de grits indica que havia insetos em atividade biológica neste produto.

· O método da flutuação é adequado para recuperação de sujidades leves (fragmentos de insetos e fragmentos de larvas).

· A maior contaminação do grits deveu-se a presença de partículas metálicas.

· A alta porcentagem de amostras contendo fragmentos de insetos indica que o grão de milho utilizado estava infestado internamente, pois o grits é retirado da porção

interna do grão de milho, sendo constituído basicamente do endosperma vítreo.

· O método da peneiração é o adequado para detecção de infestação viva, partículas metálicas e dejeções de insetos.

FUBÁ

· A grande porcentagem de amostras de fubá contendo larvas e fragmentos de larvas indica que o controle de insetos no milho pode não ter sido eficiente ou que o fubá foi infestado no armazenamento devido às condições sanitárias da indústria, caixas ou depósitos, empacotamento, expedição ou no transporte.

· A presença elevada de amostras contendo fragmentos de insetos, larvas mortas e fragmentos de larvas indica que o milho utilizado estava infestado ou que havia focos de infestação na indústria.

· Setenta e seis por cento (76,0%) das amostras de fubá estão condenadas, segundo a legislação em vigor.

· Uma leve infestação no milho em grão faz com que ocorra uma concentração de matérias estranhas no fubá.

RIALA 6/827

ATUI, M.B.; LÁZZARI, F.A.; ZAMBONI, C.Q. The effect of processing corn grain pertaining to extraneous materials in grits and corn meal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 57-63, 1998.

SUMMARY: The safety of the food is of strategic importance for public health and for the government business. In this paper the presence of extraneous materials was evaluated in corn kernels and in the processed final product (grits and corn meal). Eighty-one samples of corn kernels, eighty-one samples of grits, and eighty-one samples of corn meal, supplied by the industry, were taken during a period of four months in accordance with daily production. The analyses were done using appropriate methodologies and techniques, with modifications, described in the AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 16th edition, 1995 and in the Manual of Microscopic Analysis of Foods (Zamboni et alii, 1986).

Of the eighty-one samples of corn grain analyzed by the method of straining with a sieve, 29.6% contained live insects, 28.4% contained dead insects, and 72.8% contained metallic particles; while analysis by the method of internal insect infestation, 79.0% of the samples contained entire larvae, 37.0% contained insect heads, and 27.5% contained entire insects. Of the grits samples analyzed by the flotation method, 76.5% showed the presence of insect fragments, while the same samples analyzed by the straining method showed a predominance in the presence of metallic particles, with an 81.5% occurrence. A high contamination of larvae in cornmeal was observed at 75.3%. In reference to the cornmeal, 79.0% of the samples would be rejected by their containing insect fragments above the tolerated limit, dead larva, pupas, dead insects, mites, and hair of non-identified animals. There was an increase in the levels of extraneous materials in grits and in cornmeal due to infested corn grain.

DESCRIPTORS: extraneous materials, corn, grits, corn meal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. - 1995 - *Official methods of analysis*. 16ª ed. Washington, D C, p. 1-69.
2. BAGGIO, D. & FRANZOLIN, M.R. - 1991 - Análise e controle dos ácaros em alimentos e produtos armazenados. In: *ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS*, 7ª, São Paulo, 18p.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - 1978 - Resolução nº 12/78. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção 1, pt. 1, p. 11506. Resolução aprovada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, março de 1978.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. - 1986 - Portaria nº 1. *Diário Oficial*, Brasília, 8 abr. 1986. Seção I, p. 5039. Portaria aprovada pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde, 4 de abril de 1986.
5. CHATT, E.M. - 1964 - Adventitious metals in processed food. *World Rev. Nutr. Diet.*, Basileia, 4: 141-156.
6. CUNNINGHAM, H.M. & O'BRIEN, R. - 1972 - Ferromagnetic particles in foods. *J. Food Sci.*, 37: 572-573.
7. FOGLIAZZA, D. & PAGANI, M. - 1993 - Insect pests in stored foodstuffs in Italy. Part 1: Coleoptera. *Tecnica Molitoria*, 937-951.
8. FRANZOLIN, M.R. - 1993 - Estudo da contaminação e da flutuação anual das populações de ácaros em arroz polido (*Oriza sativa*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), comercializados à granel em mercados municipais da Cidade de São Paulo, no período de novembro de 1989 a novembro de 1990. São Paulo. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]
9. GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B & VENDRAMIN, J.D. - 1988 - *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo, Agronômica Ceres. 649 p.
10. LAZZARI, F.A. - 1993 - *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. Curitiba, Ed. do Autor, 140p.
11. PEREIRA, P.R. V.S. - 1994 - Comparação entre métodos para detecção de Coleópteros adultos (Insecta: Coleoptera) e ocorrência de fungos em trigo armazenado. Curitiba, [Dissertação de Mestrado - Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia da UFPR].
12. ROSTOM, Z.M.F. - 1993 - Survey of some granivorous and non granivorous insects and mites of stores in Saudi Arabia. *J. Stored Prod. Res.*, 29 (1): 27-31.
13. SÃO PAULO. (Estado). Leis, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, 21 out. 1978. (NTA 33).
14. SINHA, K.K. & SINHA, A.K. - 1992 - Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *J. Stored Prod. Res.*, 28 (3): 211-219.
15. SMITH, R.H. - 1995 - Rodents and Birds as Invaders of Stored-Grain Ecosystems. In: JAYAS, D.S.; WHITE, N.D.G. & MUIR, W.E. (ed.). *Stored grain ecosystems*. New York, Marcel Dekker, Inc. 757p.
16. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (SBCTA) - 1990 - *Manual de boas práticas de fabricação para a indústria de alimentos*. Campinas, SP. 27p. (Publicações avulsas, nº 1).
17. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N.; RODRIGUES, R.M.M.S.; ATUI, M.B. & PEREIRA, U. - 1986 - Manual de análise microscópica de alimentos. São Paulo, p.40 [Mimeografado].
18. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ATUI, M.B. & BATISTIC, M.A. - 1988 - Sujidades e fraudes em chocolates. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48 (1/2): 37-41.

Recebido para publicação em 04/08/97

COMPARAÇÃO ENTRE IMUNOENSAIO E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA NA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARELENONA EM AMOSTRAS DE MILHO EM GRÃO E FUBÁ*

Thais V. MILANEZ**
Márcia Bittar ATUI**
Flávio A. LÁZZARI***

RIALA 6/828

MILANEZ, T.V.; ATUI, M.B. & LÁZZARI, F.A..- Comparação entre imunoenensaio e : cromatografia em camada delgada na dcterminação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 65-71, 1998.

RESUMO: Duas técnicas, uma delas utilizando cromatografia em camada delgada e outra ensaio imunoenzimático (ELISA) foram comparadas na determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. Para tal, foram analisadas sete amostras de milho em grão e vinte amostras de fubá provenientes de uma indústria no Estado do Paraná. O método imunoenzimático mostrou-se mais simples e mais rápido e os níveis obtidos foram um pouco superiores àqueles obtidos por cromatografia em camada delgada. Falsos resultados positivos foram observados com o método imunoenzimático tornando-se necessária a confirmação da identidade das micotoxinas pesquisadas.

DESCRITORES: ELISA, cromatografia em camada delgada, imunoenensaio, aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, milho, fubá.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona são metabólitos tóxicos, conhecidos como micotoxinas produzidos por determinadas cepas fúngicas em condições adequadas. Micotoxinas têm grande importância devido aos danos provocados à saúde humana e animal e também quanto aos prejuízos financeiros provocados.^{10,12}

As aflatoxinas são produzidas por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são contaminantes naturais de vários produtos como milho, amendoim e ração animal. Elas são altamente tóxicas, especialmente a aflatoxina B₁ (AFB₁) que é considerada o mais potente carcinógeno humano^{5,23}.

A ocratoxina A (OA) é mutagênica, teratogênica e nefrotóxica principalmente em suínos e parece estar envolvida na etiologia da nefropatia endêmica dos Balcãs. Esta micotoxina é produzida por algumas cepas de *Aspergillus*

ochraceus e *Penicillium verrucosum* em produtos diversos como trigo, cevada, milho, café cru, feijão.^{12,23}

A zearalenona (ZEA) é um metabólito produzido por algumas cepas de *Fusarium graminearum* (*F. roseum*), *F. culmorum* e *F. crookwellense* principalmente em cereais como trigo, cevada, triticale e milho com teor de umidade superior a 22,0%. O principal efeito em animais é o hiperestrogenismo, sendo os suínos os animais mais sensíveis.^{10,12,22,23}

Devido aos danos provocados à saúde animal e humana e em consequência aos prejuízos financeiros provocados tem-se despertado grande interesse no desenvolvimento de técnicas rápidas e sensíveis para determinação de micotoxinas em alimentos, rações e fluidos biológicos.

Muitos métodos analíticos para determinação de micotoxinas têm sido desenvolvidos para os mais variados produtos alimentícios tanto para consumo humano como animal e também em fluidos biológicos.^{3,8,15,18,20,21}

* Realizado nas Seções de Microscopia Alimentar e Química Biológica da Divisão de Bromatologia e Química – INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902 – São Paulo -SP

** Do Instituto Adolfo Lutz

*** Da Universidade Federal do Paraná

Os métodos variam quanto ao preparo da amostra, sua complexidade e forma de determinação. Muitos deles são precisos porém necessitam de um preparo longo das amostras e, às vezes, complexo.^{3,8,9,15,18,19,20,21}

Tradicionalmente tem-se utilizado a cromatografia em camada delgada (CCD) que vem sendo substituída nos últimos anos pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e mais recentemente tem sido desenvolvidos métodos imunquímicos para detectar não apenas AFB₁ como também outras micotoxinas como ocratoxina A, vomitoxina, zearalenona, e fumonisinas.^{4,13}

Existem atualmente no comércio vários tipos de kits baseados em métodos imunoenzimáticos (ELISA) tanto para a detecção qualitativa como para a determinação quantitativa de micotoxinas.^{13,14,17} Tem-se observado a grande aceitação deste tipo de kits de imunoensaio, tanto pela facilidade de uso quanto pela rapidez na obtenção dos resultados.

A legislação brasileira segundo o Ministério da Saúde (Resolução 34/76 da CNNPA)² apresenta um limite máximo de 30 µg kg⁻¹ para a somatória das aflatoxina B₁ e G₁ e de acordo com as normas do MERCOSUL¹¹ (Grupo Mercado Comum) é de 20 µg kg⁻¹ para a somatória das quatro aflatoxinas (Resolução 56/94 internalizada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento pela portaria nº 183 de 21/03/1996)¹. Não existem valores estabelecidos para a ocratoxina A e zearalenona.

O objetivo deste trabalho foi comparar duas técnicas distintas, uma baseada em cromatografia camada delgada e outra numa técnica imunoenzimática quanto à determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho e fubá.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas sete amostras de milho em grão e vinte amostras de fubá provenientes de uma indústria no Estado do Paraná, no período de 24 de agosto à 17 de dezembro de 1994. As amostras de trabalho foram retiradas de vários pontos da amostra original e acondicionadas em sacos plásticos sob refrigeração até o procedimento das análises.

Métodos

Foram utilizados dois métodos:

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

- método descrito por Soares & Rodriguez-Amaya²¹ que utiliza cromatografia em camada delgada (CCD) usan-

do placas prontas de sílica. A mudança de fase móvel e cromatografia bi-dimensional forneceram dados para auxiliar a identidade das micotoxinas, porém a confirmação foi efetuada por derivação química com ácido trifluoroacético (TFA) com formação dos derivados característicos das aflatoxinas B₁ e G₁.¹⁶

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

- método imunoenzimático utilizando Kits ELISA (VERATOX, kits quantitativos para determinação de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A) fabricados por NEOGEN Corporation, Lansing, MI, EUA. Esta técnica utilizou 50 g da amostra moída e homogeneizada, extração com solução aquosa de metanol 70% com agitação manual vigorosa por três minutos. Procedeu-se filtração com papel Whatman nº1 e do filtrado retirou-se 100 µl para proceder-se a análise imunoenzimática de acordo com as orientações do fabricante destes "kits".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que constam nas Tabelas 1 e 2 permitem uma comparação entre as duas técnicas na determinação das aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. O método imunoenzimático utilizado permite apenas a determinação do total das aflatoxinas e o método cromatográfico permite a determinação de cada uma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Tabelas 3 e 4).

Utilizando-se os Kits Veratox os valores obtidos foram maiores do que aqueles valores encontrados nas análises efetuadas por CCD, sendo que, de forma geral, os resultados obtidos pelas duas técnicas foram concordantes.

Grande parte das amostras de fubá analisadas apresentou baixos teores de aflatoxinas pela técnica imunoenzimática e pelo método CCD os valores foram menores e próximos aos limites de detecção das aflatoxinas.

Quanto às amostras de fubá 3,4,5,6,8,12,15,17,20 (Tabela 2) supõe-se, no caso das aflatoxinas, de que se tratam de resultados falsos positivos, pois apesar de terem sido determinadas pelo método imunoenzimático não foram sequer detectadas pelo método CCD. Ainda não está claro até que ponto o problema de reações cruzadas foi superado na determinação das aflatoxinas na análise por métodos imunoenzimáticos.

A amostra 6 de milho (Tabela 1) apresentou 44,2 µg kg⁻¹ de aflatoxina total pelo método imunoenzimático. Entretanto pelo método cromatográfico nada foi detectado de qualquer das aflatoxinas, é possível que este comportamento possa ser devido ao processo de amostragem utilizado para as amostras de milho. A distribuição das micotoxinas é heterogênea exigindo uma amostragem bem

TABELA 1 - Determinação de micotoxinas em amostras de milho em grão utilizando técnicas de CCD e ELISA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$).

AMOSTRAS	ELISA			CCD*		
	Aflatoxinas**	OA	ZEA	Aflatoxinas**	OA	ZEA
1	nd	nd	166,6	2,5	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	44,2	nd	nd	nd	nd	nd
7	38,2	nd	nd	20,0	nd	nd

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

** somatória

Limites de detecção para CCD obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Limites de detecção dos "kits":

Aflatoxinas: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 100,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

TABELA 2 - Determinação de micotoxinas em amostras de fubá utilizando técnicas de CCD e ELISA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$).

AMOSTRAS	ELISA			CCD *		
	Aflatoxinas**	OA	ZEA	Aflatoxinas**	OA	ZEA
1	4,9	2,2	nd	6,0	nd	nd
2	6,0	2,4	nd	8,0	nd	nd
3	5,0	3,0	nd	nd	nd	nd
4	3,6	2,2	nd	nd	nd	nd
5	4,9	2,3	nd	nd	nd	nd
6	3,7	2,6	nd	nd	nd	nd
7	4,9	nd	nd	2,5	nd	nd
8	4,1	9,5	nd	nd	nd	nd
9	7,6	7,3	nd	3,0	nd	nd
10	7,3	6,8	nd	2,5	nd	nd
11	7,2	5,8	nd	2,5	nd	nd
12	6,6	4,4	nd	nd	nd	nd
13	7,8	3,4	nd	2,5	nd	nd
14	7,4	4,1	nd	2,5	nd	nd
15	8,8	3,4	nd	nd	nd	nd
16	8,3	3,6	nd	4,5	nd	nd
17	9,1	2,6	nd	nd	nd	nd
18	9,0	4,6	nd	3,5	nd	nd
19	8,4	6,0	nd	3,5	nd	nd
20	2,2	4,9	nd	nd	nd	nd

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

** somatória

Limites de detecção para CCD obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Limites de detecção dos "kits":

Aflatoxinas: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 100,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

TABELA 3- Determinação de aflatoxinas por CCD em amostras de milho em grão ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)*.

AMOSTRAS	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Aflatoxinas
1	nd	nd	2,5	nd	2,5
2	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd
6	2,5	nd	nd	nd	nd
7	15,0	5,0	nd	nd	20,0

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

Limites de detecção para CCD

obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

TABELA 4 - Determinação de aflatoxinas por CCD em amostras de fubá ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)*.

AMOSTRAS	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Aflatoxinas
1	6,2	nd	nd	nd	6,2
2	7,5	nd	nd	nd	8,0
3	nd	nd	nd	nd	nd
4	2,5	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd
7	2,5	nd	nd	nd	2,5
8	nd	nd	nd	nd	nd
9	nd	nd	3,0	nd	3,0
10	2,5	nd	nd	nd	2,5
11	2,5	nd	nd	nd	2,5
12	nd	nd	nd	nd	nd
13	2,5	nd	nd	nd	2,5
14	2,5	nd	nd	nd	2,5
15	nd	nd	nd	nd	nd
16	2,5	2,0	nd	nd	4,5
17	nd	nd	nd	nd	nd
18	2,5	1,0	nd	nd	3,5
19	2,5	1,0	nd	nd	3,5
20	nd	nd	nd	nd	nd

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

Limites de detecção para CCD

obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

feita. No caso das amostras de fubá o próprio processamento já garante a homogeneidade das amostras, o que pode ser observado pelos resultados que foram mais concordantes para as duas técnicas utilizadas.

Observou-se na determinação de ocratoxina A que os valores encontrados para milho e fubá pelo método imunoenzimático, estavam quase na totalidade abaixo do limite de detecção do método CCD. Com exceção das amostras 8 e 10 de fubá que apresentaram 9,5 e 7,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ocratoxina A, respectivamente (Tabela 2). Desta forma não é possível fazer uma comparação efetiva entre as duas técnicas, apenas considerando que muitos destes valores pequenos encontrados possam ser presuntivos positivos pois não havia metodologia mais sensível à disposição para confirmá-los.

Alguns autores tem estudado a correlação entre os resultados de CCD e ELISA. HONGYO et al.⁶ compararam o desempenho de um teste ELISA com CCD e CLAE para determinação de AFB₁ em milho contaminado e ração e os resultados obtidos indicaram boa correlação entre os três métodos analíticos.

Poucos kits ELISA comerciais tem sido avaliados em estudos colaborativos interlaboratoriais¹⁸ e de forma geral observa-se boa correlação desta técnica com métodos convencionais como CCD e CLAE. Os kits comerciais avaliados por estudos colaborativos tem causado muita controvérsia pois alguns deles já estudados tem seus resultados modificados em função do contínuo avanço da técnica imunoenzimática. Pestka et al.¹⁴ fizeram levantamento dos kits comerciais disponíveis e segundo este levantamento, o kit Veratox tem limites de detecção para aflatoxinas 5 ppb e para zearalenona 250 ppb, valores estes que já foram modificados. Estes mesmos autores verificaram que algumas vezes extratos de alimentos sem micotoxinas podem interferir na ligação micotoxina-enzima ao anticorpo fase sólida e neste caso a resposta falsa positiva quando comparada à curva padrão preparada no solvente extrator com tampão.

HORWITZ et al.⁷ avaliaram os parâmetros de precisão através de dados provenientes de um estudo colaborativo para detecção de micotoxinas utilizando CCD, CLAE e ELISA. De acordo com os resultados obtidos, os autores verificaram uma precisão insatisfatória entre os laboratórios participantes deste estudo, pois a precisão dos métodos para determinação de micotoxinas é inferior quando comparada à determinação de macroanalitos. Isto é resultado da baixa concentração do analito e problemas com calibração e padrões. Os métodos imunoenzimáticos levam a crer que tem precisão mais pobre comparados aos métodos CCD

e CLAE, além disso os métodos imunoenzimáticos mostraram grande variabilidade nos seus resultados (30-300%) e baixa reprodutibilidade.

Existem kits de imunoenensaio específicos para determinação de aflatoxina B₁ e outros para determinação do total de aflatoxinas como o utilizado neste estudo que não determina níveis exatos de cada uma delas e portanto dificulta seu uso nas análises para vigilância sanitária e pesquisa. Os laudos emitidos para fiscalização devem explicitar valores de aflatoxinas B₁ e G₁ presentes nas amostras para desta forma atender à exigência da Legislação Brasileira, Resolução 34/76 da CNNPA que determina limite máximo de 30 $\mu\text{g/kg}$ (ppb) na somatória das aflatoxinas B₁ e G₁². Este fato torna os "kits" pouco indicados para órgãos envolvidos com a fiscalização.

Segundo Horwitz et al.⁷ os métodos de triagem são métodos rápidos e confiáveis na eliminação de um grande número de amostras negativas (ou positivas) para restringir o número de amostras que requerem a aplicação de um método mais rigoroso. No caso de micotoxinas resultados falsos positivos são aceitáveis pois serão checados por métodos confirmatórios, mas os resultados falsos negativos devem ser ausentes.

Os "kits" atendem de forma geral às necessidades da indústria e do campo, pois a técnica de imunoenensaio é um teste rápido e simples que permite verificar a qualidade da matéria-prima que está sendo adquirida, quanto à presença de micotoxinas quando comparado por outros métodos, seja CLAE ou CCD, que requerem limpeza por partição líquido-líquido ou coluna cromatográfica, o que toma muito mais tempo de análise.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização dos kits se mostrou adequada para a determinação de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A em amostras de milho e derivados desde que os resultados sejam sempre confirmados por outras técnicas para evitar resultados falsos positivos.

Os kits são fáceis de operar, rápidos, utilizam pouca vidraria e pequenos volumes de solventes orgânicos diminuindo o risco de exposição do analista. A melhor atitude ao adotar esta técnica é avaliá-la criteriosamente de acordo com o nível de precisão e o propósito requeridos.

A maior utilidade destes kits é no campo, armazéns e indústrias que precisam fazer uma triagem rápida para aceitar ou rejeitar determinado produto ou lote.

MILANEZ, T.V.; ATUI, M.B. & LÁZZARI, F.A. - Comparison between immunoassay and thin-layer chromatography for determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn and corn meal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 57-71,1998.

ABSTRACT: Two techniques, one of them using thin-layer chromatography and the other enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were compared for the determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone. Seven samples of corn and twenty samples of corn meal from an industry in Paraná State were analysed for this purpose. The ELISA method was simpler to use, faster, showing higher concentrations than the thin-layer chromatography method. False positives requiring confirmation of the mycotoxins were observed with the ELISA method.

DESCRIPTORS: ELISA, thin-layer chromatography, immunoassay, aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, corn and corn meal.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à NEOGEN Corporation-Michigan, ALTECH do Brasil pelo fornecimento dos kits para análise de micotoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc., Portaria nº183 de 21/03/1996 que internaliza a Resolução 56/94 do Mercado Grupo Comum, Ministério da Agricultura e Abastecimento. *Diário Oficial*, Brasília, 25 mar. 1996.
2. BRASIL, Leis, decretos, etc.- Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, pt.I, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
3. CHAMBON, P.; DANO, S.D.; CHAMBON, R. & GEACHAN, A. Rapid determination of aflatoxin M₁ milk and milk products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 259(2): 372-374, 1983.
4. CHU, F.S.; UENO, I. Production of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:1125-1128, 1977.
5. IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to man. Lyon, 1975. *Some naturally occurring substances*. Lyon, IARC, 1976. p.51-72 (IARC Monographs, 10)
6. HONGYO, K.I.; ITOH, Y.; HIFUMI, E.; TAKEYASU, A. Comparison of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay with thin-layer chromatography and liquid chromatography for aflatoxin B₁ determination in naturally contaminated corn and mixed feed. *J. AOAC Internat.*, 75(2): 307-312, 1992.
7. HORWITZ, W.; ALBERT, R.; NESHEIM, S. Reliability of mycotoxin assays - an update. *J. AOAC Internat.*, 76(3): 461-491, 1993.
8. LANSDEN, J.A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 964-966, 1986.
9. LANSDEN, J.A. Liquid chromatographic analysis system in peanuts. for a cyclopiazonic acid. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67: 728-731. 1984.
10. LAZZARI, F.A. 1993. *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. Curitiba, Ed. do Autor, 140p.
11. MERCOSUL GMC \ Resolução nº 56/94 - Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas.
12. MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J. Stored Prod. Res.*, 31 (1): 1-16, 1995..
13. MORGAN, M.R.A.; KANG, A.S. & CHAN, H.W.S. Aflatoxin determination in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 908-914, 1986.
14. PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N. & SUTKINO Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technology*, 49(2): 120-128, 1995.
15. PONS, W.A. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62: 586-594, 1979.
16. PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58: 163-164, 1975.
17. SCOTT, P.M. Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern.*, 76:112, 1993.
18. SCOTT, P.M. Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 12(9): 373-381, 1993.
19. SCOTT, P.M.; LAU, P. & KANHERE, S.R. Gas chromatography with electron capture and mass

- spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 1364-1371, 1981.
20. SHANNON, G.M.; SHOTWELL, O.L. & KWOLEK, W.F. Extraction and thin layer chromatography of aflatoxin B₁ in mixed feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66: 582-586, 1983.
21. SOARES, L.V.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72(1):22-26,1989.
22. WATSON, S.A. & RAMSTAD, P.E. 1987 - Corn: Chemistry and Technology. St. Paul, M.N.: American Association of Cereal Chemists, Inc., 605 p.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION – Mycotoxins. Geneva, WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria, 11).

Recebido para publicação em 07/11/97

COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM NECTARINA (*PRUNUS PERSICA*) BRASILEIRA

HELENA TEIXEIRA GODOY
DÉLIA B. RODRIGUEZ-AMAYA*

RIALA 6/829

Godoy, H.T. & Rodriguez-Amaya, D.B. - Composição de carotenóides em nectarina brasileira. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 73-79, 1998.

RESUMO: Foi determinada pela primeira vez a composição de carotenóides de nectarina (*Prunus persica*). Onze carotenóides foram identificados: 13-*cis*- β -caroteno, *trans*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, *trans*- ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, *trans*- β -criptoxantina, *trans*-luteína, *trans*-zeaxantina, *trans*-violaxantina, *trans*-mutatoxantina e *trans*-auroxantina. O principal carotenóide foi a *trans*- β -criptoxantina ($3,9 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$), perfazendo 40,6% do total de carotenóides ($9,6 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$), seguida pela *trans*-zeaxantina ($1,6 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$), *trans*-luteína ($1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$) e *trans*- β -caroteno ($1,0 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$). O valor de vitamina A, proveniente de isômeros *cis* e *trans* da β -criptoxantina e do β -caroteno foi de $54 \pm 5 \text{ ER/100 g}$. A composição de carotenóides de nectarina mostrou-se muito semelhante a do pêssego, fato esperado já que estas frutas pertencem à mesma família.

DESCRITORES: carotenóides, valor de vitamina A, nectarina.

INTRODUÇÃO

Como corantes naturais, os carotenóides desempenham um papel decisivo na escolha e compra de muitos alimentos pelos consumidores. A sua importância, no entanto, vai mais longe que o atributo da cor e reside nas suas funções fisiológicas. Destas, a atividade pró-vitáminica A de alguns deles é a mais estabelecida, reconhecida ao longo de muitos anos. Conseqüentemente, a determinação de pró-vitamina A tem sido considerada uma parte fundamental da análise de nutrientes. Outras funções foram mais recentemente atribuídas aos carotenóides, tais como inibição de câncer, fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de doenças cardiovasculares^{2,3,4,6,13,20,21,22,23,25,33}. Estas atividades não são restritas às pró-vitaminas A, portanto, a determinação da composição completa de carotenóides tornou-se indispensável.

Ao contrário das frutas tropicais e sub-tropicais, nas quais os carotenóides predominam, as frutas de clima temperado são tipicamente pobres em carotenóides e ricas em antocianinas. Pêssego, damasco, nêspera e nectarina são praticamente as únicas frutas de clima temperado que são carotenogênicas. Por isso, o pêssego é a fruta mais estudada nos Estados Unidos em termos da composição de carotenóides ou somente em relação às pró-vitaminas A^{9,12,17,18,26,27}. Algumas investigações sobre os carotenóides de damasco^{10,18} e nêspera¹⁶ já foram também realizadas. Surpreendentemente, a composição de carotenóides em nectarina não foi ainda determinada. O único trabalho encontrado na literatura, de Bureau & Bushway⁵ determinou apenas as pró-vitaminas A, β -caroteno e β -criptoxantina.

No presente trabalho, a composição de carotenóides de nectarina (*Prunus persica*) produzida no Brasil foi determinada.

* Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6121, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os frutos de nectarina vieram da cidade de Limeira, estado de São Paulo, e foram adquiridos em supermercados e feiras-livres da região de Campinas. Cinco lotes foram analisados, sendo que cada lote foi composto de 5 a 10 frutos. Para cada lote, após a retirada das sementes, as polpas foram homogeneizadas em liquidificador tipo "Waring". Utilizou-se cerca de 100 g de polpa homogeneizada para a determinação de carotenóides.

Métodos

Várias precauções foram tomadas para evitar a isomerização e degradação dos carotenóides durante a análise, tais como: rapidez na conclusão da análise, controle da temperatura (<35°C) nas etapas de concentração, realização da saponificação a temperatura ambiente, proteção aos pigmentos da luz solar e artificial.

A composição de carotenóides foi determinada de acordo com RODRIGUEZ *et alii*²⁸. Resumidamente, o procedimento encontra-se esquematizado na Figura 1. Para a separação dos isômeros *cis* e *trans* de β -caroteno e β -criptoxantina, as frações destes carotenóides obtidos na coluna de MgO:HifloSupercel foram individualmente recromatografadas em coluna de Ca(OH)₂. Os isômeros do β -caroteno foram eluídos da coluna com éter de petróleo puro; já para os isômeros da β -criptoxantina utilizou-se como eluente 10% de acetona em éter de petróleo.

Na identificação dos carotenóides, foram considerados conjuntamente os seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna, espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e visível, valores de Rf na camada delgada de sílica gel e reações químicas, como metilação com metanol acidificado, acetilação com anidrido acético, fotoisomerização catalizada por iodo e teste para epóxidos.

Utilizou-se um espectrofotômetro de duplo feixe, marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 6, para registrar os espectros na faixa de comprimento de onda de 300 a 550 nm. Os máximos de absorção foram então comparados com os dados tabelados por DAVIES¹¹.

A quantificação foi feita a partir da absorvância máxima, aplicando-se a Lei de Beer, utilizando os coeficientes de absorção tabelados por DAVIES¹¹ e os determinados por GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA¹⁵ para os isômeros do β -caroteno e da β -criptoxantina. Os resultados foram expressos em μ g de carotenóides por g de amostra.

O valor de vitamina A foi calculado considerando a atividade vitamínica A de cada isômero de carotenóide precursor (53% para o 13-*cis*- β -caroteno, 100% para o *trans*- β -caroteno, 38% para o 9-*cis*- β -caroteno, 42% para neo- β -criptoxantina, 57% para *trans*- β -criptoxantina)^{1,32}

e o fator de conversão de 6 μ g de *trans*- β -caroteno correspondendo a 1 ER (equivalente de retinol), estabelecido pelo NAS-NRC²⁴.

Para a obtenção do perfil da composição de carotenóides por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) uma pequena alíquota, do mesmo extrato aplicado na coluna aberta, foi injetada em um cromatógrafo a líquido Varian. O equipamento era constituído por um sistema de bombeamento ternário (modelo 5010), uma válvula injetora tipo "rheodyne", uma alça de amostragem de 10 μ l de capacidade, um detector UV-visível Varian (modelo 5100), operando a 450 nm, e um integrador-registrador Varian (modelo 4400). A separação cromatográfica se procedeu em coluna C₁₈ (5 μ m) de 250 x 4.6 d.i. mm marca Vydac 201-TP54 (Vydac Separation Group, Hesperia, CA), protegida por uma coluna de guarda C₁₈ (10 μ m) de 30 x 4.6 d.i. mm, marca Micropore MCH-120 (Varian). Operou-se sempre de modo isocrático, utilizando-se metanol:água (98:2) como fase móvel, numa vazão de 1,5 ml/min. Os pigmentos foram identificados por cromatografia com padrões e frações isoladas das colunas de MgO:HifloSupercel e Ca(OH)₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição qualitativa

Os frutos maduros de nectarina apresentaram os seguintes carotenóides: 13-*cis*- β -caroteno, *trans*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, *trans*- ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, *trans*- β -criptoxantina, *trans*luteína, *trans*zeaxantina, *trans*violaxantina, *trans*mutatoxantina e *trans*-auroxantina. As principais características dos pigmentos identificados estão apresentadas na Tabela 1 e os resultados das reações químicas encontram-se na Tabela 2.

β -Caroteno (β , β -caroteno) e ζ -caroteno (7,8,7',8'-tetrahydro- ψ , ψ -caroteno) foram identificados através da forma e máximos de absorção dos espectros na região do visível (Tabela 1). A ausência de grupos substituintes foi demonstrada pela eluição destes carotenos (hidrocarbonetos) junto com a frente do solvente na camada delgada de sílica gel, desenvolvida por metanol 3% em benzeno.

Para as xantofilas, carotenóides que contém oxigênio além de carbono e hidrogênio, a estrutura básica (acíclica ou cíclica, número de ligações duplas conjugadas) também foi indicada pelos espectros de absorção. Os grupos substituintes manifestaram-se primeiramente pelos Rfs mais baixos na camada delgada de sílica gel desenvolvida por metanol 3% em benzeno (Tabela 1). A β -criptoxantina, um monohidroxi-carotenóide, apresentou um Rf de 0,51 e a zeaxantina, um carotenóide dihidroxilado, apresentou um Rf de 0,11.

TABELA 1 - Principais características dos carotenóides de nectarina.

Pigmentos	λ máx (nm) ^a	$A_{1cm}^{1\%b}$	Atividade de pró-vit. A (%) ^c	Valor de RF camada delgada	Reações químicas
13-cis- β -caroteno	336 (422) 443 472	1730	53	0,97	Cis +
trans- β -caroteno	(424) 448 474	2592	100	0,99	trans +
9-cis- β -caroteno	335 (420) 444 471	2370	38	0,97	cis +
ζ -caroteno	378 397 424	2555	-	0,96	trans +
não identificado		432 2592	-	0,68	trans +
neo- β -criptoxantina	335 (422) 446 472	2386	50	0,49	acet. + cis +
trans- β -criptoxantina	(424) 447 474	2386	57	0,51	acet + trans +
luteína	423 446 474	2350	-	0,19	met + acet. +
zeaxantina	(422) 448 472	2350	-	0,11	acet. +
violaxantina	418 444 468	2550	-	0,09	acet. + epox. +
mutatoxantina	400 426 447	2592	-	0,11	acet. + epox. +
auroxantina	382 402 426	1850	-	0,07	acet. + epox. +

a Máximos de absorção em éter de petróleo; parênteses significam um ombro no lugar de pico.

b Dados tabelados por Davies¹¹ e Godoy & Rodríguez-Amaya¹².

c Zechmeister¹³ e Bauernfeind¹.

O tipo e posição dos grupos substituintes foi verificado pelas reações químicas (Tabela 2). A presença de hidroxilas em β -criptoxantina (β,β -caroten-3-ol), luteína (β,ϵ -caroteno-3,3'-diol), zeaxantina (β,β -caroteno-3,3'-diol), violaxantina (5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -caroteno-3,3'-diol), mutatoxantina (5,8-epoxi-5,8-

dihidro- β,β -caroteno-3,3'-diol) e auroxantina (5,8,5',8'-diepoxi-5,8,5',8'-tetrahidro- β,β -caroteno-3,3'-diol) foi confirmada pela reação positiva à acetilação com anidrido acético. A posição alílica de uma das duas hidroxilas da luteína foi demonstrada pela resposta positiva à metilação com metanol acidificado. A existência de epóxidos nas

TABELA 2 - Reações químicas das xantofilas encontradas em nectarina.

Xantofilas	Acetilação com anidrido acético	Metilação com metanol acidificado catalizado por HCl	Rearranjo epóxido-furanóide
β -criptoxantina	aumento do Rf de 0,51 para 0,90	negativa	nenhuma mudança
luteína	aumento do Rf de 0,19 para 0,92	aumento de Rf de 0,19 para 0,40	nenhuma mudança
zeaxantina	aumento do Rf de 0,11 para 0,88	negativa	nenhuma mudança
violaxantina	aumento do Rf de 0,09 para 0,84	negativa	deslocamento hipocrosômico de 40 nm
mutatoxantina	aumento do Rf de 0,11 para 0,86	negativa	nenhuma mudança
auroxantina	aumento do Rf de 0,07 para 0,85	negativa	nenhuma mudança

valores de Rf calculados na camada delgada de sílica gel desenvolvida por metanol 3% em benzeno.

posições 5,6 e 5',6' na violaxantina, indicada pelos máximos de absorção ligeiramente mais baixos que os do β -caroteno, foi confirmada pelo deslocamento hipsocrômico de aproximadamente 40 nm após a adição de HCl diluído, refletindo a transformação aos furanóides 5,8 e 5',8'. Os máximos de absorção aproximadamente 20 e 40 nm mais baixos que os do β -caroteno (Tabela 1) demonstraram a ocorrência de um e dois epóxidos, já nas posições 5,8 e 5',8' em mutatoxantina e auroxantina, respectivamente. A presença de epóxidos foi também indicada pela mudança da cor amarela ou laranja do carotenóide para azul na camada delgada após exposição a vapores de HCl concentrado.

A configuração *cis* ou *trans* dos carotenóides foi demonstrada pelos máximos de absorção dos *cis* isômeros ligeiramente mais baixos que os do *trans* carotenóide correspondente e picos *cis* na região ultravioleta, evidente nos isômeros do β -caroteno (Tabela 1). Além disso os isômeros *trans* sofreram um deslocamento hipsocrômico e os *cis* um deslocamento batocrômico com a fotoisomerização.

Um pigmento, que eluiu após o β -caroteno, apresentou um único máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ a 432 nm em éter de petróleo e a 443 nm em metanol), forma característica de cetocarotenóide, porém não respondeu à redução com NaBH_4 . A resposta negativa à acetilação mostrou que o composto não apresentava hidroxilas e após exposição a vapores de HCl não ocorreu mudança na coloração da mancha, indicando a ausência de grupo epóxido. Embora não tenha sido possível a sua identificação nem por

espectrometria de massa, devido à pequena quantidade, uma estimativa da concentração foi feita baseada na absorvidade do β -caroteno.

Utilizou-se a CLAE também para a obtenção do perfil da composição de carotenóides. Mesmo sem quantificar, o cromatograma obtido por CLAE confirmou a predominância da β -criptoxantina.

Composição quantitativa

O principal pigmento encontrado foi a β -criptoxantina, representando 40,6% do conteúdo total de carotenóides de 9,6 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 3). Dos pigmentos encontrados na nectarina, são precursores de vitamina A o β -caroteno, a β -criptoxantina e os isômeros *cis* de ambos, fornecendo um valor de vitamina A de 54 RE/100 g. Em comparação com outras frutas brasileiras, a nectarina é apenas uma fonte moderada de pró-vitamina A (Tabela 4). Além do conteúdo baixo de carotenóides, a nectarina tem como principal pró-vitamina a β -criptoxantina, que possui 57% da biopotência do β -caroteno. Em termos de β -criptoxantina (Tabela 4), a nectarina é uma fruta de conteúdo médio.

BUREAU & BUSHWAY⁵ encontraram 0,5 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno e 0,3 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina em nectarina dos EUA, proporcionando um valor médio de vitamina A de apenas 11 RE/100g. Como estes autores não saponificaram as amostras, os ésteres de β -criptoxantina, forma predominante em frutas, não foram quantificados, explicando o baixo teor de β -criptoxantina.

TABELA 3 - Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (ER/100g) de nectarina*

Carotenóides	Concentração ($\mu\text{g/g}$)		
	Intervalo	Média \pm DP *	%
13- <i>cis</i> - β -caroteno	ND - 0,2	0,1 \pm 0,1	0,9
<i>trans</i> - β -caroteno	0,8 - 1,1	1,0 \pm 0,2	10,4
9- <i>cis</i> - β -caroteno	ND - 0,1	0,1 \pm 0,1	0,8
<i>trans</i> - ξ -caroteno	0,1 - 0,2	0,2 \pm 0,1	2,1
não-identificado	ND - 0,1	0,1 \pm 0,1	0,9
neo- β -criptoxantina	0,2 - 0,6	0,3 \pm 0,2	3,1
<i>trans</i> - β -criptoxantina	3,2 - 4,5	3,9 \pm 0,7	40,6
luteína	1,0 - 1,4	1,1 \pm 0,2	11,4
zeaxantina	1,1 - 2,0	1,6 \pm 0,3	16,7
violaxantina	0,5 - 0,9	0,8 \pm 0,1	8,3
mutatoxantina	ND - 0,1	-	-
auroxantina	ND - 1,0	0,4 \pm 0,3	4,2
Total	8,9 - 10,2	9,6 \pm 0,7	
Valor de vitamina A	48 - 60	54 \pm 5	

* Média e desvios padrão de 5 lotes analisados em duplicata

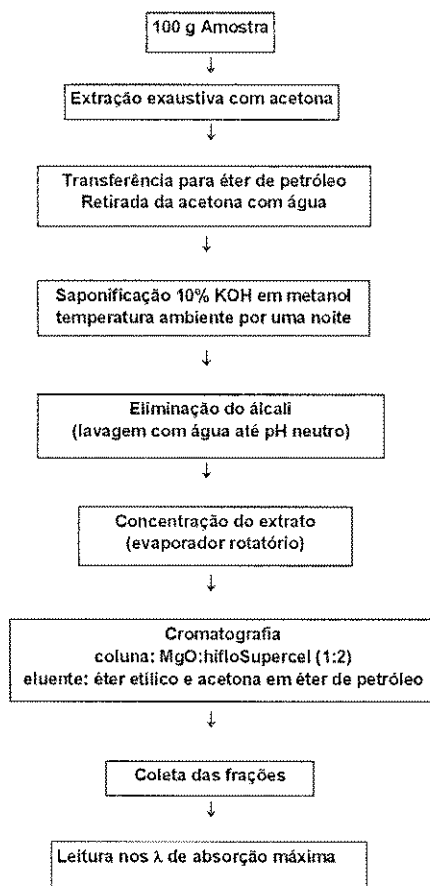
ND - não detectado; DP - desvio padrão

TABELA 4 - Comparação dos teores de β -criptoxantina ($\mu\text{g/g}$) e vitamina A (RE/100g) presente em frutas brasileiras*.

Fruta / cultivar ^{referência}	β -criptoxantina	valor de vitamina A
Acerola ⁷	3,6	64
Cajá ²⁹	16,9	190
Cajú ⁸		
Amarelo	0,5	16
Vermelho	1,1	42
Cyphomandra betacea ³⁰	14,0	250
Mamão ^{13,19,31}		
Solo	9,1	120
Tailândia	9,7	140
Comum	8,1	110
Formosa	8,6	190
Manga ¹⁴		
Haden	0,6	120
Tommy Atkins	0,4	220
Bourbon	0,4	140
Extrema	0,7	430
Ouro	0,8	310
Nectarina	3,9	54
Nespera ¹⁵	4,8	180
Pêscoço ¹⁵		
Rei da Conserva	6,4	88
Diamante	4,1	55
Chileno	5,1	73
Piqui ¹⁵	4,4	54
Pitanga ⁷	47,0	990

* valores são médias de 3 a 5 lotes analisados em duplicata.

Figura 1 - Esquema da determinação de carotenóides em nectarina



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte fi-

nanceiro e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa.

RIALA 6/829

GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Carotenoid composition of Brazilian nectarine (*Prunus persica*). Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(1): 73-79, 1998.

ABSTRACT: The carotenoid composition of nectarine (*Prunus persica*) was determined for the first time. Eleven carotenoids were identified: 13-*cis*- β -carotene, *trans*- β -carotene, 9-*cis*- β -carotene, *trans*- ζ -carotene, neo- β -cryptoxanthin, *trans*- β -cryptoxanthin, *trans*-lutein, *trans*-zeaxanthin, *trans*-violaxanthin, *trans*-mutatoxanthin and *trans*-auroxanthin. The principal carotenoid was *trans*- β -cryptoxanthin ($3.9 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$), accounting for 40.6 % of the total carotenoid content ($9.6 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$), followed by *trans*-zeaxanthin ($1.6 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$), *trans*-lutein ($1.1 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$) and *trans*- β -carotene ($1.0 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$). The vitamin A value, provided by β -cryptoxanthin and β -carotene *cis* and *trans* isomers, was $54 \pm 5 \text{ RE/100 g}$. The carotenoid composition of nectarine resembled that of peach; this is understandable since both fruits belong to the same family.

DESCRIPTORS: carotenoids, vitamin A value, nectarine

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUERNFEIND, J.C. - Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.*, 20: 456-473, 1972.
2. BENDICH, A. - Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.*, 119: 112-115, 1990.
3. BENDICH, A. - Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 66: 1017-1024, 1994.
4. BENDICH, A. & OLSON, J.A. - Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 3: 1927-1932, 1989.
5. BUREAU, J.L. & BUSHWAY, R.J. - HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J. Food Sci.*, 51: 128-130, 1986.
6. BYERS, T. & PERRY, G. - Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Am. Rev. Nutr.*, 12: 139-159, 1992.
7. CAVALCANTE, M.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: CHARALAMBUS, G. (ed), *Food Science and Human Nutrition*, p. 643-50, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1992.
8. CECCHI, H.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *J. Food Sci.*, 46: 147-149, 1981.
9. CURL, A.L. - The carotenoids of cling peaches. *Food Res.*, 24: 413-421, 1959.
10. CURL, A.L. - The carotenoids of apricots. *Food Res.*, 25: 190-196, 1960.
11. DAVIES, B.H. Carotenoids. In GOODWIN, T.W.(ed), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed., vol. 2, p. 38-165, London, Academic Press, 1976.
12. GEBHARDT, S.E.; ELKINS, E.R.; HUMPHREY, J. - Comparison of two methods for determining the vitamin A value of clingstone peaches. *J. Agric. Food Chem.*, 25: 629-632, 1977.
13. GERSTER, H. - Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Inter. J. Vit. Nutr. Res.*, 61: 277-291, 1991.
14. GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Carotenoid composition of commercial mangoes from Brazil. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22: 104-106, 1989.
15. GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1306-1313, 1994.

16. GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Determination of the carotenoids and vitamin A value of Brazilian loquats (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 45: 113-124, 1995.
17. GROSS, J. - Carotenoid changes in the mesocarp of the Readhaven peach (*Prunus Persica*) during ripening. *Z. Pflanzenphysiol*, 94: 461-465, 1979.
18. KHACHIK, F.; BEECHER, G.R.; LUSBY, W.R. - Separation, identification and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe and pink grapefruit by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 1465-1473, 1989.
19. KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; YOKOYAMA, S.M. - Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 24: 415-418, 1991.
20. KRINSKY, N.I. - Carotenoids in medicine. In: KRINSKY, N.I., MATHEWS-ROTH, M.M. & TAYLOR, R.F. (eds.), *Carotenoids: Chemistry and Biology*, p. 279-291, New York, Plenum Press, 1990.
21. KRINSKY, N.I. - The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 66: 1003-1010, 1994.
22. MATHEWS-ROTH, M.M. - Carotenoids and cancer prevention experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.*, 57: 717-722, 1985.
23. MATHEWS-ROTH, M.M. - Recent progress in the medical application of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63: 147-156, 1991.
24. NAS-NRC - *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed, p. 78-92, Washington, National Academy of Science/National Research Council, 1989.
25. OLSON, J.A. - Biological actions of carotenoids. *J.Nutr.*, 19: 94-95, 1989.
26. PHILIP, T. & CHEN, T.S. - Development of a method for the quantitative estimation of provitamin A carotenoids in some fruits. *J. Food Sci.*, 53: 1703-1706, 1988.
27. QUACKENBUSH, F.W. - Reverse phase HPLC separation of *cis* and *trans* carotenoids and its application to beta-carotene in food materials. *J. Liq. Chromatogr.* 10: 643-653, 1987.
28. RODRIGUEZ, D.B.; RAYMUNDO, L.C.; LEE, T.C.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. - Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* 40: 615-622, 1976.
29. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. - Composição de carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 9: 148-162, 1989.
30. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. - Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit *Cyphomandra betacea*. *Food Chem.*, 12: 61-65, 1983.
31. WILBERG, V.C. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. *Lebesm. Wiss. Technol.*, 28: 474-480, 1995.
32. ZECHMEISTER, L. - *Cis-trans Isomeric Carotenoids Vitamins A and Aryl Polyenes*, Vienna, Springer-Verlag, 1962.
33. ZIEGLER, R.G. - Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 251-259, 1991.

Recebido para publicação em 04/06/97

MATÉRIAS ESTRANHAS EM DOCES DE AMENDOIM E DE LEITE VENDIDOS POR AMBULANTES NA CIDADE DE SÃO PAULO *

Regina M. Morelli S. RODRIGUES **
Marlene CORREIA **
Márcia Regina FRANZOLIN ***
Domingos BAGGIO ***

RIALA 6/830

RODRIGUES, R.M.M.S.; CORREIA, M.; FRANZOLIN, M.R.; BAGGIO, D. - Matérias estranhas em doces de amendoim e de leite vendidos por ambulantes na Cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 81-86, 1998.

RESUMO: Foram analisadas 351 amostras de doces de amendoim e 157 de doces de leite, no período de janeiro/1993 a janeiro/1994, adquiridas mensalmente em dez barracas de ambulantes de doces, distribuídas em quatro regiões da Cidade de São Paulo/SP. O objetivo do trabalho foi a adequação de métodos para pesquisa de matérias estranhas e avaliação das condições sanitárias desses produtos, durante as quatro estações do ano, utilizando-se métodos da "Association of Official Analytical Chemists", 15 ed., 1990. Os métodos permitiram obter material adequado para leitura e identificação das matérias estranhas, sem resíduos interferentes que dificultassem o diagnóstico da análise. Do total de amostras de doces de amendoim e de leite, 32,8% e 28,7%, respectivamente, estavam aprovadas, segundo as normas legais vigentes brasileiras. Das 351 amostras de doces de amendoim, 60,7% continham fragmentos de insetos, 11,7% ácaros e 6,8% estavam contaminadas com pêlos de roedor. Das 157 amostras de doces de leite, 58,6% estavam contaminadas por fragmentos de insetos, 26,8% por ácaros e 5,7% por pêlos de roedor. Os números médios de fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedor, em relação às amostras condenadas, foram 8,6; 11,3 e 1,4 para os doces de leite e 6,5; 6,5 e 1,1 para os doces de amendoim, respectivamente. As estações do ano que apresentaram o maior percentual de amostras positivas para fragmentos de insetos e pêlos de roedor foram o outono e o inverno, para os doces de amendoim, e o outono para os doces de leite; para ácaros, o maior percentual de amostras positivas ocorreu no verão.

DESCRIPTORIOS: matérias estranhas; sujidades leves; análise microscópica; doce de amendoim; doce de leite.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de métodos para isolamento e detecção de matérias estranhas em alimentos, assim como, o estabelecimento de legislação pertinente tem recebido grande importância em países como os Estados Unidos^{6,17} e Canadá^{11,18} enquanto que nos países europeus¹⁹ existem variações quanto ao estabelecimento de métodos específicos para tais pesquisas e a legislação pertinente exige a ausência de insetos, larvas, ovos, excrementos de roedores em todos os tipos de alimentos.

Embora recente, o Brasil é pioneiro na América Latina na pesquisa de matérias estranhas, iniciada em 1978, na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz. Desde então tem-se verificado o crescente estudo de matérias estranhas em diversos produtos alimentícios, como farinha de rosca^{21,25}, sucos²³, produtos da merenda escolar²², queijos¹², milho e grits⁴ e outros. Porém, como etapa inicial, as pesquisas têm-se voltado muito mais para a aplicação de métodos já oficializados, como os publicados pela "Association of Official Analytical Chemists"⁶ e pelo "Health Protection Branch"¹¹, utilizando-os em produ-

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do IAL/ SP

** Da Seção de Microscopia Alimentar do IAL/ SP

*** Do Departamento de Parasitologia do ICB/ USP

tos nacionais do mesmo tipo de produto para o qual o método foi desenvolvido^{12,26}. Tal fato justifica-se pela necessidade premente de implantá-los nos Laboratórios Oficiais de Saúde Pública, para o efetivo controle das condições higiênicas dos produtos nacionais e para as propostas de alteração na legislação em vigor^{9,24}, constatando-se crescente interesse de sua implantação nas indústrias de alimentos e laboratórios privados de controle de qualidade.

Em nível nacional, as pesquisas em matérias estranhas reportam a resultados concretos constatados através da publicação das Portarias 1/86⁸ e 74/94¹⁰, do Ministério da Saúde, onde se estabelecem limites de tolerância para fragmentos de insetos em farinhas e derivados.

Devido a constante necessidade de ampliar o campo de atuação no controle de qualidade de alimentos aliada a importância da pesquisa de matérias estranhas, muitas vezes são necessários estudos para adequação de métodos, quer para torná-los viáveis frente a estrutura dos laboratórios nacionais, quer para padronizá-los em produtos com características semelhantes àqueles utilizados para o desenvolvimento das referidas metodologias.

De um modo geral os doces são produtos de inigualável aceitação mundial. No Brasil, o doce de leite e o de amendoim são bastante populares, principalmente, entre a população infantil. Tanto na produção industrial como na artesanal, são produtos susceptíveis à contaminação por matérias estranhas como qualquer outro alimento¹⁵. Assim, a inexistência de métodos para isolamento de matérias estranhas em doces de amendoim e de leite e a conseqüente ausência de informações sobre a contaminação desses produtos levaram ao desenvolvimento da presente pesquisa, cujos objetivos foram: a adequação de metodologia para detecção de matérias estranhas, a avaliação da contaminação e a correlação com as estações do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

a. Amostragem

Foram analisadas, no período de janeiro de 1993 a janeiro de 1994, 351 amostras de doces de amendoim, sendo 86 paçocas cilíndricas, 79 paçocas em tablete, 124 doces de amendoim em tablete e 62 pés-de-moleque. Foram também analisadas 157 amostras de doces de leite, sendo 80 em tablete, 46 doce de leite com coco em tablete e 31 doce de leite pingo. Dos 7 tipos de doces, somente a paçoca em tablete e o doce de leite pingo apresentaram embalagem individual. As amostras foram congeladas até o momento da análise, utilizando-se 100g de cada uma, em duplicata.

As amostras foram adquiridas, mensalmente, em 10 barracas de ambulantes da Cidade de São Paulo/SP, localizadas: 2 no Largo de Pinheiros, 3 na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar - Hospital da Clínicas, 2 na Lapa e 3 em Santo Amaro.

b. Metodologia

b.1. Pesquisa de sujidades leves em doce de amendoim

Para extração de sujidades leves em doces de amendoim em tablete, paçoca e pé-de-moleque, foi utilizado o método descrito na AOAC para determinação de sujidades e matérias estranhas em pasta de amendoim².

b.2 Pesquisa de sujidades leves em doce de leite

Na determinação de sujidades leves nos doces de leite (em tablete e pingo), utilizou-se o método da AOAC para amido³, com modificações, sendo descrito a seguir o procedimento utilizado:

Fragmentou-se a amostra em pequenos pedaços e pesou-se 100 g em béquer de 1000 ml. Adicionou-se 600 ml de Igepal a 2% quente (55-70 °C) ao béquer e aqueceu-se em banho-maria até a dissolução da amostra, agitando, ocasionalmente, com bastão de vidro. Transferiu-se quantitativamente a amostra para peneira nº 230, lavando-se com água filtrada quente (50-60 °C), até não ocorrer formação de espuma. Transferiu-se o resíduo da peneira para o béquer e lavou-se a peneira com água filtrada quente (50-60 °C), recolhendo-se no mesmo béquer. O conteúdo do béquer foi filtrado a vácuo, sobre papel de filtro riscado, lavando-se as paredes do béquer com água filtrada quente (50-60 °C) e filtrando-se no mesmo papel. O papel de filtro foi transferido para placa de Petri e o material foi examinado ao microscópio estereoscópico, sob aumento de 30x.

b.3. Pesquisa de sujidades leves em doce de leite com coco

Para as amostras de doce de leite com coco em tablete, foi utilizado o método da AOAC de extração de sujidades leves em coco em pedaços¹.

b.4. Análise estatística

Aplicou-se o teste de duas proporções com aproximação normal⁵, para determinar se havia diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos de doces (amendoim e leite) e os tipos de matérias estranhas e entre estas e as estações do ano. Considerou-se $\alpha = 0,05$ e "z" de $\alpha = 1,96$ como nível de rejeição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como não havia métodos padronizados para extração de matérias estranhas nos doces em estudo, foram testadas metodologias descritas pela AOAC para produtos correlatos, como o método para pasta de amendoim² e para coco ralado¹, nos doces de amendoim e no doce de leite com coco, respectivamente. A partir dos ensaios realizados aplicando-se os princípios básicos dos métodos de extração de matérias estranhas que são utilizados em ami-

dos³ adequou-se o procedimento analítico, que apresentou os melhores resultados quanto à recuperação e a facilidade de leitura do material extraído, para os demais tipos de doce de leite.

A utilização de solução detergente e da lavagem da amostra em peneira na etapa de pré-tratamento, permite a liberação da matéria estranha do produto e a remoção de substâncias interferentes¹³, como gorduras e açúcares presentes em maior quantidade nos doces de amendoim e de leite, respectivamente.

As soluções alcoólicas em água diminuem o peso específico e a tensão superficial do meio aquoso, aumentando a eficiência do umedecimento dos elementos histológicos dos vegetais, permitindo uma melhor sedimentação dos mesmos e, conseqüentemente, uma extração mais eficaz das matérias estranhas²⁰. Concordantemente, observou-se que nos doces de amendoim e no doce de leite com coco, a solução alcoólica a 55% e a de isopropanol a 40%, respectivamente, dificultou a flutuação do espermoderma do amendoim (*Arachis hypogaea*) e do endosperma do coco (*Cocos nucifera*). O posterior tratamento com solução ácida e aquecimento também aumentou a eficiência do umedecimento dos elementos histológicos, pela remoção dos solventes orgânicos da superfície dos vegetais¹³, além de remover amidos e proteínas do produto, com comprovada eficiência²⁷.

Observou-se que o material obtido na extração pelos 3 métodos propostos foi adequado para leitura e identificação das matérias estranhas isoladas das amostras, por não apresentar resíduo de elementos histológicos vegetais que dificultasse o diagnóstico, aspectos de elevada importância nos estudos de novas metodologias^{13,14}.

Na Tabela 1 estão representados o total de amostras e os resultados obtidos quanto ao número e percentual de amostras positivas para fragmentos de insetos, ácaros e

pêlos de roedor para cada tipo de doce analisado.

O alto consumo dos doces aliado, em alguns casos, à baixa produção, impediu a aquisição mensal de igual número de amostras para todos os produtos. Apesar da variação no número de amostras analisadas, observa-se na Tabela 1 que, tanto para os doces de amendoim como para os de leite, o maior percentual de amostras com matérias estranhas ocorreu pela presença de fragmentos de insetos (60,7% e 58,6%, respectivamente) e percentuais bem menores para pêlos de roedor (6,8% e 5,7%, respectivamente), não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os dois grupos de doces quanto à contaminação por fragmentos de insetos e pêlos de roedor. O mesmo não ocorreu com a contaminação por ácaros (11,7% dos doces de amendoim e 26,8% dos doces de leite), que foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), onde se verifica que a diferença deveu-se ao alto índice de contaminação do doce de leite com coco (50,0%). FRANZOLIN e col.¹⁶ correlacionaram o alto grau de contaminação de doces de leite com coco por ácaros com o teor protéico e de gordura do produto. Ainda segundo os mesmos autores, a presença de ácaros e seus ovos nos doces de amendoim e de leite sugere manipulação e armazenagem inadequadas, além da falta de higiene.

Dos doces analisados, o doce de leite pingo foi o único que não apresentou contaminação por pêlo de roedor (Tabela 1). Embora o número de amostras analisadas tenha sido menor, o resultado mostra que é viável obter produtos em condições de higiene mais adequadas, talvez devido a uma maior proteção contra ataque de roedores nos locais de fabricação.

Das amostras positivas, foram determinados, como medidas descritivas, o total, a média e o intervalo de variação de cada matéria estranha, apresentados na Tabela 2, com valores semelhantes de média e de intervalo de variação entre os dois grupos de doces, tanto para fragmentos

Tabela 1. Total de amostras e amostras positivas para fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedor, segundo o tipo de doce.

Tipo de doce	Total	Amostras positivas					
		Fragm. inseto		Ácaro		Pêlo de roedor	
		nº	%	nº	%	nº	%
Paçoca cilíndrica	86	49	57,0	5	5,8	7	8,1
Paçoca tablete	79	46	58,2	9	11,4	4	5,1
Doce de amendoim tablete	124	81	65,3	24	19,3	8	6,4
Pé-de-moleque	62	37	59,7	3	4,8	5	8,1
Total	351	213	60,7	41	11,7	24	6,8
Doce de leite tablete	80	55	68,8	15	18,8	3	3,8
Doce de leite com coco	46	30	65,2	23	50,0	6	13,0
Doce de leite pingo	31	7	22,6	4	12,9	0	0,0
Total	157	92	58,6	42	26,8	9	5,7

fragm. inseto: fragmento de inseto
nº = número de amostras positivas

Tabela 2. Medidas descritivas de matérias estranhas, nas amostras positivas, em doces de amendoim e de leite.

Tipo de doce	Matéria estranha								
	Fragm. inseto			Ácaro			Pêlo roedor		
	n°	x	i.v.	n°	x	i.v.	n°	x	i.v.
Amendoim	1375	6,5	1-41	272	6,5	1-36	27	1,1	1-2
Leite	793	8,6	1-44	486	11,3	1-60	11	1,4	1-2

Fragm. inseto: fragmento de inseto; n° = total; x = média; i.v. = intervalo de variação

de insetos (6,5 e 8,6; [1-41] e [1-44], respectivamente) como para pêlos de roedor (1,1 e 1,4; [1-2] e [1-2], respectivamente), enquanto que, para ácaros, os valores foram maiores nos doces de leite.

Como a incorporação de contaminantes em um alimento pode ocorrer nas várias etapas que envolvem a sua elaboração, o produto final pode conter 1 ou mais tipos de matérias estranhas, concomitantemente. Neste estudo, cada amostra analisada apresentou de 0 a 3 tipos de matérias

estranhas e nas Figuras 1 e 2 são apresentados os percentuais de amostras, segundo o número de tipos de matérias estranhas para os doces de amendoim e de leite, respectivamente.

Observa-se, nas Figuras 1 e 2, que a contaminação por somente 1 tipo de matéria estranha prevaleceu em todos os tipos de doces de amendoim e nos doces de leite em tablete e para o doce de leite pingo verifica-se predominância para ausência de matérias estranhas.

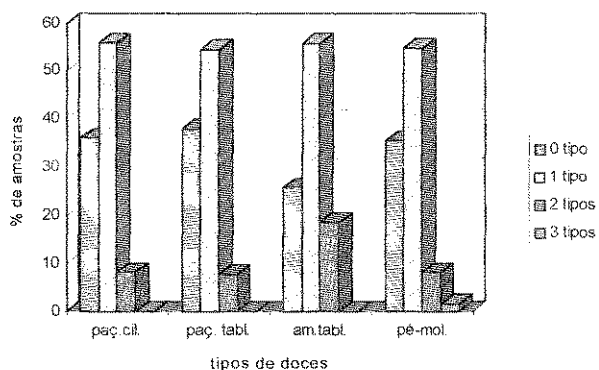
Dos produtos analisados, o doce de leite com coco apresentou o maior percentual de amostras contaminadas por 2 e 3 tipos de matérias estranhas, 42% e 35% de amostras, respectivamente, e o menor percentual de amostras, 18%, com ausência de contaminação (Figura 2).

Nas Figuras 3 e 4 são apresentados os percentuais de amostras positivas para fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedor, de doces de amendoim e de leite, respectivamente, segundo as estações do ano.

Para os dois grupos de doces, obteve-se um número elevado de amostras contendo fragmentos de insetos durante todo o ano (Figuras 3 e 4), sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a contaminação por fragmentos de insetos apresentada pelos doces de amendoim adquiridos no inverno, quando comparadas com amostras colhidas no verão e outono; para os doces de leite a contaminação nas amostras adquiridas no outono só foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação àquelas colhidas na primavera. A ocorrência dos fragmentos de insetos nas amostras, independente da estação do ano, sugere contaminação da matéria prima associada à falta de condições higiênicas durante o processamento.

Nos doces de amendoim e de leite (Figuras 3 e 4), os ácaros foram encontrados em percentual mais elevado nas amostras colhidas no verão, onde as condições ambientais de temperatura e umidade são favoráveis ao seu desenvolvimento ⁷, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a contaminação por ácaros apresentada pelo total dos dois grupos de doces em relação às demais estações do ano.

No conjunto dos dois grupos de doces, pêlos de roedor foram encontrados em maiores percentagens de amostras adquiridas no inverno e outono, épocas em que intensifica a troca de pêlos, que caem durante a locomoção do animal, podendo se misturar ao alimento ou ficar aderido à sua superfície ⁷, sendo estatisticamente significativa



paç. cil.: paçoca cilíndrica; paç. tabl.: paçoca tablete
am. tabl.: amendoim tablete; pé-mol.: pé-de-moleque

Figura 1. Percentagem de amostras de doces de amendoim, segundo o número de tipos de matérias estranhas.

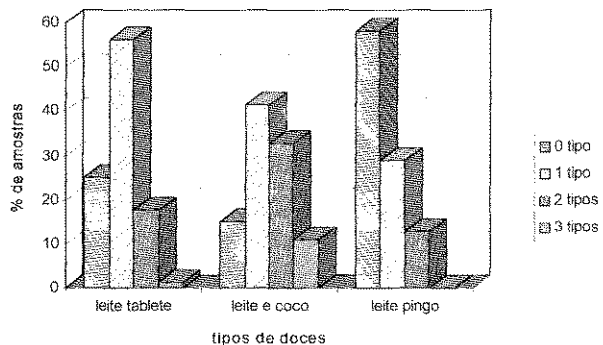


Figura 2. Percentagem de amostras de doces de leite, segundo o número de tipos de matérias estranhas.

contaminação apresentada nessas duas épocas em relação às outras estações do ano.

Como a legislação em vigor para alimentos ^{9,24} exige ausência de sujidades, parasitos e larvas para os doces em estudo, verifica-se que, aproximadamente, 70% das amostras (Tabela 3) estavam em desacordo com a legislação ^{9,24}. Este índice de condenação aliado ao conceito de níveis de defeitos aceitáveis para estabelecimento de limites de tolerância sugerem que novos dados devam ser obtidos para propor alterações na legislação.

Tabela 3. Número e percentagem de amostras, aprovadas e condenadas, segundo a legislação brasileira, quanto ao tipo de doce.

Amostras	Tipo de doce			
	Amendoim		Leite	
	nº	%	nº	%
Aprovadas	115	32,8	45	28,7
Condenadas	236	67,2	112	71,3
Total	351	100,0	157	100,0

nº = número de amostras analisadas

CONCLUSÕES

Os métodos utilizados foram adequados para pesquisa de matérias estranhas em doces de amendoim e de leite e sua implantação é viável nos laboratórios de Microscopia Alimentar.

As matérias estranhas encontradas nos doces de amendoim e de leite foram fragmentos de insetos, em maior número, seguido por ácaros e pêlos de roedor.

Em relação as estações do ano, os fragmentos de insetos e pêlos de roedor predominaram nos doces de amendoim adquiridos no outono e no inverno e nos doces de leite adquiridos no outono; os ácaros predominaram nos doces adquiridos no verão.

Estavam em desacordo com a legislação, 67,2% dos doces de amendoim e 71,3% dos doces de leite.

Como o percentual de amostras contendo fragmentos de insetos foi elevado, novos estudos devem ser realizados para propostas de alterações na legislação em vigor.

RIALA 6/830

RODRIGUES, R.M.M.S.; CORREIA, M.; FRANZOLIN, M.R. & BAGGIO, D. - Light filth in peanuts and "milk sweet" bars, sold by street merchants in the city of São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1); 81-86, 1998.

ABSTRACT: In the period of January 1993 to January 1994, 351 samples of peanut bars and 157 samples of "milk sweet" bars, sold by street merchants localised at four regions in the city of São Paulo/Brazil, were analysed to study filth contamination: methodology and sanitary conditions. The methods for filth determination, based on AOAC, were shown to be appropriate for both products because they permit recovery and identification of filth without vegetable interference. 32.8% of peanut and 28.7% of "milk sweet" bars were approved based on the Brazilian legislation. It was found that 60.7% of the samples of peanut bars were contaminated with insect fragments, 11.7% with mites, and 6.8% with rodent hairs. For the samples of "milk sweet" bars, 58.6% were contaminated with insect fragments, 26.8% with mites, and 5.7% of the samples were contaminated with rodent hairs. The average values of filth were higher in "milk sweet" (insect fragments - 8.6%; mites - 11.3; rodent hairs - 1.4) than in peanut bars (insect fragments - 6.5; mites - 6.5; rodent hairs - 1.1). The mites presented large numbers of positive samples in the summer, the rodent hairs presented large numbers of positives samples in the fall and the winter, and the insect fragments were detected in samples analysed throughout the year, mainly in the fall and the winter.

DESCRIPTORS: extraneous materials; light filth; microscopic analysis; peanut bars; "milk sweet" bars.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ————. - *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15 ed. Washington, D.C., AOAC, 1990. p. 379.
- 2 - ————. - *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15 ed. Washington, D.C., AOAC, 1990. p. 380.
- 3 - ————. - *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15 ed. Washington, D.C., AOAC, 1990. p. 385.
- 4 - ATUI, M.B. - Monitoramento de matérias estranhas, fungos e micotoxinas em milho em grão, grits e fubá. Curitiba, PR, 1996. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná].
- 5 - BERQUÓ, E. S. et alii - Bioestatística. 1ª ed. Rev. São Paulo, EPU, 1981.
- 6 - BOESE, J.L. & BANDLER, R. - Extraneous Materials: Isolation. In: HELRICH, K. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical*

- Chemists*. 15 ed., Arlington, VA., AOAC, 1990. v1. p. 369-424.
- 7 - BOESE, J.K. - Mites. In: GORHAM, J.R. (ed.) *Principles of Food Analysis for Filth, Decomposition and Foreign Matter*. Washington, D.C., AOAC/FDA, 1990. p. 63-82. (FDA Technical Bulletin 1).
- 8 - BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria nº 1, de 4 de abril de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 8 abr 1986. Seção I, p.5039. Estabelece provisoriamente o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos a nível microscópico, em 100 (cem) gramas do produto... até que sejam concluídos os estudos de revisão da Resolução Nº 12/78 - CNNPA.
- 9 - BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Normativa nº 12/78, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. 1. p. 11506. Aprova normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, relativas a alimentos e bebidas.
- 10 - BRASIL. Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 74, de 4 de agosto de 1994, da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 5 ago 1994. Seção I, pt. I, p. 11809-11. Estabelece o limite máximo de até 75 fragmentos de insetos, ao nível microscópico, em 50 (cinquenta) gramas de farinha de trigo e de até 225 fragmentos de insetos em 225 (duzentos e vinte e cinco) gramas para os derivados, na média de 3 amostras cada, até que novos estudos sejam concluídos.
- 11 - COMPENDIUM OF ANALYTICAL METHODS - HEALTH PROTECTION BRANCH - CANADA - HPB - Methods and Laboratory Procedures of Extraneous Material Analysis for Food. Montreal, Polyscience, 1991. v4.
- 12 - CORREIA, M. - Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo. São Paulo, SP, 1995. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
- 13 - DENT, R.G. - Elements of filth detection. In: GORHAM, J.R. (ed.) *Principles of Food Analysis for Filth, Decomposition and Foreign Matter*. Washington, DC, AOAC/FDA, 1990. p. 173-80. (FDA Technical Bulletin 1).
- 14 - EISENBERG, W.V. - Extraneous materials in foods: regulatory methods & product control. *Cereal Science Today*, St. Paul, MN, 13 (6): 228-9, 232, 1968.
- 15 - EISENBERG, W.V. - Sources of Food Contaminants. In: GORHAM, J.R. (ed.) *Principles of Food Analysis for Filth, Decomposition and Foreign Matter*. Washington, DC, AOAC/FDA, 1990. p. 11-25. (FDA Technical Bulletin 1).
- 16 - FRANZOLIN, M.R.; BAGGIO, D.; CORREIA, M. & RODRIGUES, R.M.M.S. Presença de ácaros em doces de amendoim e de leite vendidos por ambulantes na cidade de São Paulo, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 54(1): 11-5, 1994.
- 17 - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *The Food Defect Action Levels: Current Levels for Human Use that Present No Health Hazard*. Washington, D.C. Department of Health and Human Services/Public Health Service Food and Drug Administration Bureau of Foods.
- 18 - HEALTH PROTECTION BRANCH, HEALTH AND WELFARE (HPB). Ottawa, Ontario, HPB, 1984. 5p.
- 19 - MAES, E. E. A. Extraneous materials in foods: a review of filth control in Western Europe. *JAOAC*, Washington, D.C., 49(6): 1176-80, 1966.
- 20 - NICHOLSON, J.F.; HARRIS, K.L. & YAKOWITZ, M.G. - Principles of Isolation of Food and Drug Contaminants. In: HARRIS, K.L. & REYNOLDS, H.L. (ed.) *Microscopic-Analytical Methods in Food and Drug Control*. Washington, USDHEW/FDA, 1960. p. 29-54. (Food and Drug Technical Bulletin 1).
- 21 - RODRIGUES, R. M. M. S.; SANTOS, M. C. & ZAMBONI, C. Q. - Farinha de rosca: matérias estranhas pesadas e leves. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 50(1/2): 245-9, 1990.
- 22 - RODRIGUES, R. M. M. S.; SANTOS, M. C. & ZAMBONI, C. Q. - Matérias estranhas leves e pesadas em pós para pudim e gelatina, destinados à merenda escolar. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 10(2): 261-72, 1990.
- 23 - SANTOS, M. C.; RODRIGUES, R. M. M. S. & ZAMBONI, C. Q. - Sucos de maracujá, tamarindo e uva: métodos de análise das condições higiênicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 50(1/2):239-43, 1990.
- 24 - SÃO PAULO. Leis, Decretos etc. - Decreto n.º 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 20 out., 1978. p.273, 277 (NTA 56, 58). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
- 25 - ZAMBONI, C. Q. & RODRIGUES, R. M. M. S. - Comparação entre métodos de extração de sujidades leves em farinhas de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 45(1/2): 13-20, 1985.
- 26 - ZAMBONI, C. Q.; ALVES, H. I.; BATISTIC, M. A.; RODRIGUES, R. M. M. S.; ATUI, M. B. & SANTOS, M. C. - Sujidades e fraudes em amidos e féculas. *B. CEPPA*, Curitiba, 9(1): 1-8, 1991.
- 27 - ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 49(1): 11-7, 1989.

Recebido para publicação em 15/4/97