

ISSN 0073-9855

REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

RIALA 6

VOLUME 57

NÚMERO 2

1998



Letras & Letras[®]

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

DIRETOR RESPONSÁVEL

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

COMISSÃO DE REDAÇÃO

KIMIYO NONOYAMA, Presidente
NEUS SADOCCO PASCUET
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
THAÍS VALÉRIA MILANEZ, Secretária

SETOR DE PUBLICAÇÕES

ROCELY A. DE SOUZA BUENO

PRODUÇÃO

EDITORA LETRAS & LETRAS LTDA.

EDITOR

Carlos José Linardi

Endereço/ Address

Av. Ceci, 1945 – São Paulo

CEP 04065 – 003

Fone/Fax: (011) 577-5746 ou (011) 5581-2183

e-mail: letras@uol.com.br

Endereço/ Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246 – 902 – São Paulo – SP
(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 — 1998, 1-86
1998, 57 (2)

ISSN 0073-9855

RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

(*) 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 nº 11, 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 nº 01/82, de 27 de abril de 1982).

TABELAS - Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que deverão indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não deverão ser repetidos em gráficos, a não ser em casos especiais. Na montagem das tabelas, seguir as normas brasileiras para apresentação tabular (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA — Normas de apresentação tabular. Rio de Janeiro, IBGE, 1979, 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.... TAUNAY⁵¹ verificou.....; para dois autores.... LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando.....; para mais de dois autores: no trabalho de TSUNODA et alli⁶; ou ainda... Segundo vários autores^{1,3,7,8}.

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

Para artigos periódicos

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

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, 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 além de ser vendida é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta com periódicos nacionais ou estrangeiros.

ARTIGOS ORIGINAIS/ ORIGINAL ARTICLES

SUMÁRIO/CONTENTS

- 831 Efeito do Aquecimento na Biodisponibilidade dos Carotenóides do Azeite de Dendê Adicionado ao óleo de soja, em Ratos.
Effect of heating in biodisponibility of "dende oil" carotenoids added in soy oil on rats.
Márcia Varella MORANDI, Rosa Maria Duarte FÁVARO, Alceu Afonso JORDÃO JR, Helio VANNUCCHI & José Eduardo DUTRA DE OLIVEIRA 7-11
- 832 Presence of Bunyaviruses (Bunyamwera Serogroup) in São Paulo State, Brazil.
Presença de Bunyavirus (Sorogrupo Bunyamwera) no Estado de São Paulo, Brasil.
Adélia Hiroko NAGAMORI, Terezinha Lisieux M. COIMBRA, Elza da Silva NASSAR, Luiz Eloy PEREIRA, Luiza Terezinha M. de SOUZA, Elza Keiko KIMURA & Iray Maria ROCCO..... 13-16
- 833 Características Físico-Químicas das águas de Fontes Minerais da Região da Grande São Paulo.
Physico-Chemical Characteristics of Water From Mineral Sources of São Paulo Metropolitan Region
Linda NISHIHARA, Janete ALABURDA & Franca Durante de MAIO..... 19-25
- 834 I gA1 Proteases – Ocorrência em Agentes Etiológicos de Meningite.
I gA1 Proteases – Occurrence in Meningitis Etiological Agents 27-30
Ilka Maria LANDGRAF, Maria das Graças Adelino ALKMIN & Sônia França Correia BARBOSA
- 835 Presença de Vírus Endógeno na Linhagem Celular *Aedes albopictus* Clone C6/36 Não Infectadas.
Presence of an Endogenous Virus in Uninfected *Aedes albopictus* Cell, Clone C6/36.
Maria Luiza BARBOSA, Marli UEDA-ITO & Iray Maria ROCCO..... 31-33
- 836 Sujidades Leves em Sopas Desidratadas – Adequação de um Método Microscópico
Light filth in dried foods – Microscopic method evaluation.
Maria Helena MARTINI & José Paschoal BATISTUTI..... 35-44
- 837 *Salmonella*: Sorotipos Identificados das Cepas Isoladas de Pacientes Hospitalizados e não Hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no Período de 1978-1997.

	<i>Salmonella</i> : Serotypes identified of strains isolated from Hospitalized and Non-Hospitalized Patients, in the Presidente Prudente Area, SP, During The Period of 1978-1997. Maria Regina N. R. ESPER, Aracelis Moreno de FREITAS, Sueli A. FERNANDES, Suzel N. NEME, Ana T. TAVECHIO, Mariza M. ROMÃO & Marlene L. CAFÉ.....	45-50
838	Caracterização Microbiológica de Sangue e Plasma Bovino Visando sua Utilização em Insumos Alimentícios Microbiologic Characterization of Bovine Blood and Plasma to Aim Their Utilization In Food. Alessandra E. V. G. da SILVEIRA, Alex Augusto GONÇALVES, Cláudio da Rocha BITTENCOURT, Gilberto Alexandre Soares GOULART & Angélica M. SALCEDO	51-55
839	<i>Mammomonogamus laryngeus</i> , Ryzhikov, 1948. Ocorrência de Caso Humano no Município de Jundiaí, SP, Brasil. <i>Mammomonogamus laryngeus</i> , Ryzhikov, 1948: A new Brazilian Human case. Rosa Maria Donini Souza DIAS, Ana Célia Steffen MANGINI, Domingas M. A. Grispino Vieira TORRES & Evaldo MARCHI.....	57-60
840	Labeling Efficiency of Monoclonal Antibody of Epithelial origin tumours Using Different Chelating Agent (MDP). Heidi Pinto MARTINS, Elena S. HAMADA & Normando E. Iznaga ESCOBAR.....	61-63
841	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. II. Utilização de antígeno particulado de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em inquérito canino em regiões endêmicas. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. II. Use of particulated antigen of <i>Leishmania(V.) braziliensis</i> in canine inquires in different endemic areas. José Eduardo TOLEZANO, Helena Hilomi TANIGUSHI, Maria de Fátima Lerenó de ARAÚJO, Márcia da Conceição BISUGO, Elaine Aparecida CUNHA, Carlos Roberto ELIAS & Rui LAROSA.....	65-71
842	ARTIGO DE REVISÃO Fumonisinás: Aspectos Analíticos REVIEW — Fumonisinás: Analytical Aspects Miguel MACHINSKI JUNIOR	73-88
843	Isolamento de <i>Trypanosoma cruzi</i> Por Xenocultura após aplicação de Xenodiagnóstico In Vivo e/ou In Vitro em Pacientes na Fase Crônica da Doença de Chagas e na Co-Infecção pelo HIV. <i>Trypanosoma cruzi</i> Isolation from Xenoculture After In Vivo And/Or In Vitro Xenodiagnosis Executed In Chagasic Or Co-Infected With HIV Patients. Márcia da Conceição BISUGO, Maria de Fátima Lerenó de ARAÚJO, Elizabeth Visone NUNES, Elaine Aparecida CUNHA, Oswaldo da Cruz OLIVEIRA JUNIOR, Carmem do Socorro GUILHERME, Lorena Perez RAMIREZ & José Eduardo TOLEZANO.....	89-96

EFEITO DO AQUECIMENTO NA BIODISPONIBILIDADE DOS CAROTENÓIDES DO AZEITE DE DENDÊ ADICIONADO AO ÓLEO DE SOJA, EM RATOS

Márcia Varella MORANDI
Rosa Maria Duarte FÁVARO*
Alceu Afonso JORDÃO JR
Helio VANNUCCHI
José Eduardo DUTRA DE OLIVEIRA

RIALA 07/831

MORANDI, M. V.; FÁVARO, R. M. D.; JORDÃO JR., A. A., VANNUCCHI, H. E DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. — Efeito do Aquecimento na Biodisponibilidade dos Carotenóides do Azeite de Dendê Adicionado ao Óleo de Soja, em Ratos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 7-11, 1998.

RESUMO: O óleo de palma, conhecido no Brasil como azeite de “dendê” é o óleo extraído da polpa do fruto da palmeira *Elaeis guineensis* Jacq, sendo uma fonte muito rica de pró-vitamina A, especialmente β -caroteno. Nesse estudo comparou-se a biopotência do azeite de dendê como fonte de pró-vitamina A em relação ao β -caroteno sintético, avaliando-se também o efeito do processamento térmico sobre a biodisponibilidade da vitamina A em ratos. Foram utilizados três grupos de seis animais, previamente deficientes em vitamina A. Os animais receberam, por 20 dias, dietas contendo óleo de soja enriquecido com β -caroteno sintético, azeite de dendê sem aquecimento ou então azeite de dendê submetido ao aquecimento de 100°C por 20 minutos. Todas as dietas continham teoricamente 4 ER/grama de dieta. A concentração hepática de vitamina A foi semelhante nos grupos controle e naquele que recebeu azeite de dendê sem aquecimento prévio ($185,72 \pm 25,40$ e $150,17 \pm 33,08$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente). O grupo no qual o azeite de dendê sofreu processamento térmico mostrou um valor menor de vitamina A hepática em relação ao controle ($144,80 \pm 16,84$ e $185,72 \pm 25,40$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente). Os resultados demonstram a viabilidade do azeite de dendê como fonte pró-vitamina A mesmo sob processamento térmico, visto que os animais do grupo que receberam azeite de dendê previamente aquecido armazenaram quantidades significativas de vitamina A hepática.

PALAVRAS-CHAVE: β -caroteno, fortificação, azeite de dendê, óleo vegetal, biodisponibilidade, ratos.

INTRODUÇÃO

Os carotenóides estão presentes em inúmeros óleos vegetais tais como óleo de milho, de soja, azeite de oliva entre outros, servindo como fonte natural de pro-vitamina A. O azeite de dendê é uma fonte vegetal rica em pro-vitamina A. Azeite de dendê é o nome utilizado no Brasil, do óleo da palmeira *Elaeis guineensis* Jacq é extraído do mesocarpo do fruto do dendezeiro^{14,15}. Originário da África, tem como característica a cor laranja-avermelhada por possuir quantidades significativas de carotenóides, constituindo-se em fonte energética devido ao alto teor lipídico¹⁴. O azeite de dendê possui

altas concentrações de carotenos em termos de provitamina A, contendo mais equivalentes de retinol do que vegetais de folhas verdes escuras, cenoura e tomate, que são considerados fontes significativas de provitamina A¹⁰. O azeite de dendê é consumido em alguns países da África e na Índia¹⁴. No Brasil este óleo é comercializado, industrializado e empregado geralmente em pratos típicos, no estado da Bahia.

A deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública atingindo cerca de 230 milhões de crianças em países em desenvolvimento¹⁶. A fortificação de alimentos com a vitamina A e o β -caroteno, tem sido estudada com intuito de minimizar estes problemas.

* Instituto Adolfo Lutz — Ribeirão Preto- S.P.

** Divisão de Nutrição Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — Universidade de São Paulo-SP.

O consumo de óleos vegetais no Brasil, como por exemplo o óleo de soja, é muito grande, atingindo as diversas classes sociais inclusive a de baixa renda. O óleo de soja é produzido por diversos países onde o custo é baixo. É comumente utilizado no preparo de alimentos, sendo uma fonte energética e fonte natural de vitamina E^{2,3}. Estudos recentes em nosso laboratório tem mostrado que a vitamina A quando utilizada na forma de palmítato de retinila na fortificação do óleo de soja permanece estável durante o processo de cozimento e condições de armazenamento, e a sua biodisponibilidade testada em ratos e no homem, não é alterada^{4,5,6}. O objetivo deste trabalho foi estudar o enriquecimento do óleo de soja com azeite de dendê como fonte natural de β -caroteno, avaliando-se também o efeito do processamento térmico sobre a biodisponibilidade da vitamina A em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem Wistar, recém nascidos e amamentados por ratas recebendo dieta isenta de vitamina A e carotenóides durante 21 dias. Após este período de amamentação estes ratos permaneceram recebendo dieta isenta de vitamina A e carotenóides por mais 15 dias. Os animais foram então separados aleatoriamente em três grupos experimentais com seis animais em cada grupo. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, tendo livre acesso a dieta e água. Durante o experimento foram mantidas condições de temperatura, umidade e o ciclo claro-escuro. Todos os animais receberam a mesma quantidade de pró-vitamina A na dieta, tanto na forma de β -caroteno sintético como na quantidade de azeite de dendê, adicionado ao óleo de soja. Os animais receberam suas respectivas dietas durante 20 dias, sendo estas preparadas de acordo com a A.O.A.C.1. Após o 20º dia todos os animais foram sacrificados e retirou-se o plasma e o fígado para dosagem de vitamina A pelo método espectrofotométrico¹².

Grupo Controle:

G1-Os animais receberam dieta preparada com óleo de soja enriquecido com β -caroteno sintético, obtendo-se uma concentração final de vitamina A de 4 Equivalentes de retinol (ER)/g de dieta. O óleo de soja enriquecido permaneceu na temperatura ambiente

Grupos Experimentais:

G2- Os animais receberam dieta preparada com óleo de soja enriquecido com azeite de dendê para se obter uma concentração final de vitamina A de 4ER/g de dieta, sendo que o óleo enriquecido não sofreu nenhum tipo de aquecimento.

G3-Os animais receberam dieta com óleo de soja enriquecido com azeite de dendê submetido ao aquecimento de 100°C por 20 minutos.

Fortificação do óleo de soja com β -caroteno sintético: Foi utilizado β -caroteno sintético, 30% em suspensão, fornecido pela F. Hoffmann-La Roche Ltda., Basileia-Suíça. O β -caroteno foi adicionado ao óleo de soja na concentração de 5000 ER/100 g de óleo, para obter-se uma dieta com 4 ER/g de dieta.

Fortificação do óleo de soja com azeite de dendê: O azeite de dendê foi fornecido pela unidade da EMBRAPA localizada em Jaguariúna-SP. O azeite de dendê foi adicionado ao óleo de soja para se obter uma concentração final de 5000 ER/100 g de óleo.

Análise Estatística: Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão, sendo a comparação entre os grupos feita através da análise de variância one-way e do teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentados os pesos corporais iniciais e finais dos animais, não havendo diferença significativa entre eles. Os níveis hepáticos e plasmáticos da vitamina A encontrados nos diferentes grupos estão apresentados na tabela 2. Após vinte dias de ingestão das respectivas dietas observou-se diferença significativa entre os valores de vitamina A hepática dos grupos G1 e G3,

TABELA 1
Peso corporal inicial e final dos animais dos grupos estudados.

Grupos	G1	G2	G3
Final (g)	255,83 \pm 27,55	253,66 \pm 30,24	245,83 \pm 23,21
Inicial (g)	145,18 \pm 18,85	140,18 \pm 11,83	140,16 \pm 14,66

Valores como média \pm desvio padrão. Não existe diferença estatística entre os grupos.

TABELA 2

Concentração hepática e plasmática de vitamina A

Grupos	G1 4ER	G2 Dendê 4ER	G3 Dendê 4ER/100°C
Fígado(ug/g)	185,72 ± 25,40 b	150,17 ± 33,08 ab	144,80 ± 16,84 a
Plasma(ug%)	34,32 ± 11,22 b	27,54 ± 3,95 a	40,45 ± 9,71 b

Valores como média ± desvio padrão. Letras diferentes representam valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

existindo uma menor concentração de vitamina A no fígado dos animais que receberam dieta preparada com óleo de soja enriquecido com azeite de dendê e aquecido em relação ao grupo onde o óleo de soja foi fortificado com β -caroteno sintético. Contudo o teor de vitamina A total no fígado de animais dos grupos G2 e G3, que receberam caroteno proveniente do dendê não foram diferentes entre si. Quanto à concentração plasmática observou-se diferença significativa entre o Grupo G2 que recebeu dieta enriquecida com azeite de dendê não aquecido e Grupo G3 cujos animais receberam dieta enriquecida com azeite de dendê e foi submetido ao aquecimento à 100° C.

DISCUSSÃO

O alto teor de β -caroteno no azeite de dendê, faz com que ele seja excelente fonte de pró-vitamina A. O uso deste óleo, no entanto, é limitado a certas regiões sendo utilizado em alguns pratos típicos¹³.

A fortificação de alimentos com β -caroteno mostra-se como uma alternativa segura quando se refere à toxicidade⁸. Num estudo realizado em animais administrando-se 1mg de β -caroteno por grama de dieta a quatro gerações sucessivas de ratos, nenhum efeito danoso foi observado. Este mesmo trabalho relata que em humanos onde se utilizou diariamente uma suplementação na quantidade 120 vezes maior do que a recomendação, não foram observados efeitos adversos. O único efeito colateral foi a hiperqueratose que foi reversível quando se interrompeu ou diminuiu a utilização do suplemento⁷. Não foi observado nenhuma anormalidade significativa frente a concentrações plasmáticas elevadas de vitamina A, quanto a toxicidade, nem quando se utilizou altas doses de β -caroteno em humanos⁹.

O aumento da ingestão de alimentos ricos em β -caroteno na dieta habitual é preferível do que se sujeitar a altas doses de vitamina A sintética, podendo ser utiliza-

do como uma das estratégias para minimizar os danos causados pela carência desta vitamina além de ser uma alternativa de baixo custo^{11,18}.

O presente trabalho estudou a possibilidade de se fortificar o óleo de soja com azeite de dendê como fonte natural de carotenóides, principalmente β -caroteno, podendo eventualmente ser utilizado no combate a hipovitaminose A existente em várias regiões do Brasil^{4,5,6}.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a biodisponibilidade da vitamina A proveniente dos carotenóides do azeite de dendê adicionados ao óleo de soja, não foi afetada pelo processo térmico quando se compara os Grupos G2 (sem aquecimento) e G3 (com aquecimento à 100 °C), visto que os níveis de vitamina A total no fígado foram respectivamente 150,0 ug/g e 144,8 ug/g. Quando se comparam os Grupos G1(óleo de soja fortificado com β -caroteno sintético) e G3 (com aquecimento do óleo de soja fortificado com azeite de dendê) observa-se diferença significativa, onde os níveis hepáticos de vitamina A foram menores para o Grupo G3. No plasma foi observado diferença significativa entre os Grupos G2 (azeite de dendê sem aquecimento) e G3 (azeite de dendê com aquecimento), onde foram maiores os valores encontrados no Grupo 3. Esta diferença pode ter ocorrido devido a variação dos valores encontrados neste Grupo 3.

O azeite de dendê utilizado neste estudo estava na sua forma natural não sofrendo processo de refinamento, sendo que durante o refino pode ocorrer perda de atividade dos carotenóides¹³. Em outro estudo onde foi avaliado as mudanças ocorridas nos teores de α e β -caroteno, após armazenamento à temperatura ambiente (26°C) do azeite de dendê por 90 dias, houve perdas pequenas destes carotenóides no óleo bruto e refinado, sendo que o óleo refinado sofreu perdas consideravelmente maiores do que o bruto¹⁵.

Num estudo avaliando-se a perda de ácido ascórbico e β -caroteno no espinafre e amaranto após alguns pro-

cedimentos caseiros, foi observado perda desses nutrientes durante o cozimento tradicional por trinta minutos (56 a 72% e 16 a 20% respectivamente)¹⁷. Porém, as perdas foram menores quando o cozimento foi feito em panela de pressão durante dez minutos (42 a 68% e 11 a 16% respectivamente). Em outro estudo, o processo de cozimento tradicional (durante 8 a 10 minutos) utilizado com alguns vegetais, mostrou que a perda de β -caroteno ficou em torno de 12%. Conclui-se que existe a necessidade de esclarecimento às populações mais carentes da importância da utilização de maiores quantidades de alimentos ricos em β -caroteno.

CONCLUSÃO

O azeite de dendê utilizado em nosso estudo mostrou-se eficaz como fonte natural de β -caroteno mesmo após o aquecimento, quando avaliou-se a quantidade de vitamina A hepática e plasmática dos animais estudados.

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que o azeite de dendê pode ser utilizado como fonte natural de β -caroteno, mostrando-se viável para a fortificação do óleo de soja, mesmo quando submetido ao aquecimento, visto que o processamento térmico não alterou significativamente a biodisponibilidade da vitamina A nos grupos experimentais.

RIALA 07/831

MORANDI, M. V.; FÁVARO, R. M. D.; JORDÃO JR., A. A.; VANNUCCHI, H. E DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. — Effect of heating in biodisponibility of "dende oil" carotenoids added in soy oil on rats. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 7-11, 1998.

Palm oil known in Brazil as "dende oil" oil extracted from the fruit of the palm *Elaeis guineensis* Jacq that is a rich source of provitamin A, especially β -carotene. In the present study we compared the biopotency of this palm oil as a source of provitamin A in relation to synthetic β -carotene and evaluated the effect of thermal processing on the bioavailability of vitamin A in rats. Three groups of 6 animals each, previously deficient in vitamin A, were used. The animals received for 20 days diets with soybean oil enriched with synthetic β -carotene, palm oil not submitted to heating or palm oil submitted to heating at 100°C for 20 min. Theoretically, all diets contained 4 ER/g diet. Hepatic vitamin A concentration was similar in the control group and in the group receiving dende oil without previous heating (185.72 ± 25.40 and 150.17 ± 33.08 $\mu\text{g/g}$ tissue, respectively). The group which received heat-processed dende oil showed a lower hepatic vitamin A value than the control group (144.80 ± 16.84 and 185.72 ± 25.40 $\mu\text{g/g}$ tissue, respectively). The results demonstrate the feasibility of palm oil as a provitamin A source even after thermal processing since the animals in the group receiving previously heated dende oil stored significant amounts of hepatic vitamin A.

Key words: β -carotene, fortification, palm oil, vegetable oil, "dende oil" oil bioavailability, rats.

Endereço para correspondência: Divisão de Nutrição Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — USP. Av. dos Bandeirantes 3900. CEP. 14049.900. Ribeirão Preto — SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.O.A.C. *Official Methods of Analysis*. 12th ed. Association of Official Analytical Chemists, WASHINGTON, DC, 1975.
2. DESAI, I.D.; TAVARES, M.L.G.; DUTRA DE OLIVEIRA, B.S.; DUARTE, R.M.; DUTRA DE OLIVEIRA J.E.. Food habits and nutritional status of agricultural migrant workers of Southern Brazil. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33: 702-714, 1980.
3. DESAI, I.D.; BHAGAVAN, H.; SALKEDLD, R.; DUTRA DE OLIVEIRA J.E.. Vitamin E content of crude and refined vegetable oils in Southern Brazil. *J Food Comp. Anal.*, 1: 231-238, 1988.
4. DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; DESAI, I.D., FÁVARO, R.M.D.; FERREIRA, J.F Effect of Heat treatment during cooking on the biological value of vitamin A fortified sybean oil in human. *Internat. J. Food Sci Nutr.*, 45:203-207,1994.
5. 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 retynil palmitate in Brazil: stability during cooking and storage. *J Food Comp Anal.*, 4: 237-244, 1991.
6. FÁVARO, R.M.D.; MIYASAKA, C.R.; 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.
7. HATHCOCK, J.N. ET AL. Evaluation of vitamin A toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 183-202, 1990.
 8. HEYWOOD, R. PALMER A.K.; GREGSON R.L.; HUMMLER H. The toxicity of beta-carotene. *Toxicology*, 36: 91-100, 1985.
 9. MATHEWS-ROTH, M.M. Plasma Concentrations of carotenoids after large doses of β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52: 500-501, 1990.
 10. MAY, C.Y. Palm oil carotenoids. *Food Nutr. Bull.*, 15(2): 130-137, 1994.
 11. MUJIBUR RAHMAN, M.; WAHED, M.A.; AKBAR ALI, M. β -carotene losses during different methods of cooking green leafy vegetables in Bangladesh. *J. Food Comp Anal.*, 3: 47-53, 1990.
 12. OLSON, J.A. A simple dual assay for vitamin A and carotenoids in human liver, *Nutr. Rep. Intern.*, 19: 807-811, 1979.
 13. RODRIGUEZ-AMAYA, D. Assessment of provitamin A content of foods — The Brazilian experience. In: Two decades of progress: Linking knowledge to action. Report of the XVI International Vitamin A Consultative Group Meeting, Thailand. 1994.
 14. RUKIMINI, C. Red Palm oil to combat vitamin A deficiency in developing countries. *Food Nutr. Bull.*, 15 (2): 126-129, 1994.
 15. TRIGUEIRO, I.N.S. & PENTEADO, M.V.C. Mudanças nos teores de alfa e beta caroteno em óleo de dendê durante o armazenamento a temperatura ambiente (26°C). *B. CEPPA*, 11 (1): 1-10, 1993.
 16. UNDERWOOD, B.; MCCLATCHEY, S. Global prevalence of vitamin A deficiency and its control. In: Abstracts of the XVI International Vitamin A Consultative Group Meeting, Chiang Rai, Thailand. IVACG Secretariat, Washington, DC, 1994.
 17. YADAV, S.K. & SEHGAL, S. Effect of home processing on ascorbic acid and β -carotene content of spinach (*Spinacia oleracea*) and amaranth (*Amaranthus tricolor*) leaves. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 47: 125-131, 1995.

Recebido para publicação em 23/05/97

PRESENCE OF BUNYAVIRUSES (BUNYAMWERA SEROGROUP)
IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL

Adélia Hiroko NAGAMORI*
Terezinha Lisieux M.COIMBRA*
Elza da Silva NASSAR*
Luiz Eloy PEREIRA*
Luiza T.M.de SOUZA*
Elza Keiko KIMURA*
Iray Maria ROCCO*

RIALA 07/832

NAGAMORI, A. H., COIMBRA, T. L. M., NASSAR, E. da S., PEREIRA, L. E., SOUZA, L. T. M. de, KIMURA, E. K., ROCCO, I. M. — Presence of Bunyamwera (Bunyamwera serogroup) in São Paulo State, Brazil). Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 13-18, 1998.

ABSTRACT: Seven viruses were isolated from sentinel mice, exposed in forested area in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil, from 1974 to 1981. They included five isolates of Maguari, one of Kairi and one of Tucunduba. It was the first time that these viruses were detected in São Paulo State. The isolates were identified by the serological tests: Hemagglutination, Hemagglutination Inhibition, Complement Fixation and Neutralization in suckling mice. The results showed that these viruses belong to Bunyamwera serogroup. As there are reports of human disease caused by viruses belonging to this serogroup further studies are necessary to study ecological aspects involved in the maintenance cycles of these viruses, as well as the possibility of its transmission to human beings in State of São Paulo, Brazil.

DESCRIPTORS: Bunyavirus, Surveillance program, Sentinel mice, Isolation and Identification of viruses.

INTRODUCTION

Bunyamwera (BUN) virus is the prototype for the family Bunyaviridae and the genus *Bunyavirus*. It was first isolated from *Aedes* species in Central Africa¹⁷ and antibodies to this virus have been detected in vertebrates, including humans in the same area, as well as in South America^{9,13}. In North America, Bunyamwera serogroup viruses, isolated from mosquitoes and vertebrates, have established the geographic distribution and main vectors of Cache Valley, Tensaw, Main Drain and Lokern viruses. Serological surveys point out that some of these viruses are implicated in occasional human infection and occasional CNS infection of large mammals^{2,3,9}.

Maguari (MAG) virus (strain BeAr 7272) was previously isolated from mosquitoes, collected in the Utinga

Forest, Pará State, Brazil in 1957 and Argentina^{3,4,11,12}, subsequently from horses and cattle in Colombia and Argentina, from mosquitoes captured in Trinidad, Colombia and the French Guyana¹¹, and from various species of mammals (including humans) in Peru, Surinam and Venezuela.^{3,4,12} Serologic evidence for infection of humans, goat, cattle and equines was observed in Argentina.^{10,18} MAG virus is closely related to Cache Valley virus, which was isolated from a horse with encephalitis in the United States, but it is not responsible for epidemics.¹² It was also obtained from mosquitoes and sentinel hamsters exposed in coastal Ecuador from 1974-1978¹.

Kairi (KRI) virus (strain TRVL-8900) was first isolated from mosquitoes *Aedes (Och) scapularis* (285 mosquitoes) in Trinidad (Melajo Forest) in 1955, in

* Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos, Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Brazil (Belem-PA) and Colombia (Guayacasira), from other mosquitoes species in Trinidad and Brazil, from monkeys and a rodent in Brazil and from horses in Argentina. Antibodies to KRI virus were found in men and monkeys in Trinidad^{5,11,21}.

Tucunduba virus (unregistered) is mostly transmitted by sabethine mosquitoes and some diurnal species of other tribes. It was active in the region of Altamira (North of Brazil) from 1978 to 1981, in 1983 and 1987⁷. Tucunduba was obtained from a sick female (18 month-old) with meningoencephalitis who presented fever, headache, diarrhea, vomiting, symptoms and signs of CNS, including paresis and coma. The patient recovered without sequelae.¹⁴ Tucunduba is frequently isolated from pools of Wyeomyia mosquitoes, however, its vertebrate host is unknown²⁰.

The surveillance program on arbovirus activity, conducted between 1974 and 1981 by the Section of Arthropod-Transmitted Viruses (SATV) in the field stations, revealed the presence of some viruses, in the region of Icapara (24° 41' S, 47° 32' W), Iguape county, Ribeira Valley Region and in Guaratuba (23° 45' S, 45° 55' W) just under Casa Grande station at sea level. They included five isolations of Maguari: SPAn 83375, SPAn 83376, SPAn 83377, SPAn 83390 and SPAn 83391, one of Kairi, SPAn 83389 and one of Tucunduba, SPAn 28719, which is a member of Wyeomyia complex.

It was the first time that these viruses were detected in the State of São Paulo, Brazil. These agents have been obtained from human beings, mosquitoes, febrile horses, cattle, birds, monkeys and wild vertebrates in Trinidad, Ecuador, Guyanas, Colombia, Argentina, Panama and in the North of Brazil^{3,4,11}.

Bunyamwera serogroup viruses infect human, domestic and wild large mammals. Serologic surveys have shown evidence for such infections in humans, horses, cattle, goats, dogs, sheep, pigs, caribou, grizzly bears, bison, Dall sheep, moose and deer from Alaska to Argentina². In 1990, in the Brazilian Pantanal, neutralizing antibodies to MAG virus were detected in equine population (two years old)¹⁰.

MATERIALS AND METHODS

Virus isolation

All sentinel mice (a mother and six babies) were exposed inside the forest, for three days, after which

they were returned to the laboratory and observed daily for signs of illness: tremors, lethargy and paralysis. Sick mice were tested for virus by inoculating clarified 10% suspensions of their brains intracerebrally in suckling mice and observed daily for two weeks for signs of illness. Subsequently, two passages of brain suspensions of the infected mice were performed and after filtration through a 450 mu Millipore filter, were reinoculated by the intracerebral route (i.c.) into three litters of suckling mice.

Serological techniques for identification and characterization

The isolates were tested by Complement Fixation (CF)⁸ for preliminary serologic identification, using a battery of immune mouse ascitic fluids (MIAF) representing recognized viruses in Brazil, including members of Bunyamwera serogroup.

For virus characterization, Sodium desoxycholate sensitivity (SDC) was performed in mice¹⁹; Hemagglutination (HA) in a pH range from 6,0 to 7,0, and Hemagglutination-inhibition (HI) tests were performed according to Casals⁶, adapted to microtiter method of Takatsy, modified by Sever¹⁵, and mice Neutralization (N) according to Shope and Sather¹⁶.

RESULTS

All isolated viruses were sensitive to SDC. By the N test showed on table 1 the five isolates of MAG virus were identical to the prototype from Belem, closely related to prototype Bunyamwera and cross-reacted with less intensity with Tensaw virus. They shared CF antigens among themselves, but distinct from Anhembi.

The SP An 83389 virus was identical to prototype KRI from Belem by CF and N tests and cross-reactivity with less intensity with Bunyamwera (original strain), but distinct from the other 11 members of the serogroup (table 2).

The SP An 28719 virus was identical to Tucunduba virus and cross-reacted considerably with Wyeomyia virus (table 3). The smallest differences were observed with Taiassui, Macaua, Iaco and Anhembi viruses and the greatest differences with Sororoca and Kairi viruses.

TABLE 1

Results of mice N and CF tests with five strains of MAG virus from São Paulo and three known Bunyamwera serogroup

Antigen or virus		N				CF						
		SPAn 83375	BeAr 7272	SPAn 164102	SPAn 164107	SPAn 83375	SPAn 83376	SPAn 83377	SPAn 83390	SPAn 83391	BeAr 7272	SPAr 2984
Immune serum												
SPAn 83375		3.9 *	3.9	> 3.0	3.4	512	128	512	512	512	128	8
SPAn 83376		3.7	3.6	-	-	512	512	512	512	512	128	8
SPAn 83377		3.6	3.6	-	-	512	128	512	512	512	128	8
SPAn 83390		3.7	3.7	-	-	512	128	512	512	512	128	8
SPAn 83391		3.6	3.6	-	-	512	128	512	512	512	128	32
Maguari												
(Be Ar 7272)		3.7	3.9	> 3.0	-	128	512	128	512	128	128	32
Bunyamwera		3.5	3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tensaw												
(A9 - 171b)		> 2.0	2.4	> 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-

- not tested

* log Neutralization Index

TABLE 2

Results of mice N and CF tests with strain of Kairi (SPAn 83389) and selected Bunyamwera serogroup

Antigen or virus		N		CF			
		SPAn 83389	SPAn 83389	BeAn 8226	BeAr 671	BeAn 278	SPAn 83375
Immune serum							
PAAn 83389		3.6 *	64	32	0	0	0
Kairi (BeAr 8226)		3.8	64	64	0	0	0
Bunyamwera (original)		2.0	16	-	-	-	-
Taiassui (BeAn 671)		0	0	-	512	-	-
Tucunduba (BeAr 278)		0.4	0	-	-	256	-
Tucunduba (SPAn 28719)		0.4	0	-	-	-	128
Maguari (SPAn 83375)		1.0	0	-	-	-	-
Wyeomyia (original)		0.5	-	-	-	-	-
Anhembi (SPAr 2984)		0.4	-	-	-	-	-
Macaua (BeAr 306329)		0.5	-	-	-	-	-
Xingu (BeH 388464)		0.8	-	-	-	-	-
Guaroa (BeH 22063)		0.3	-	-	-	-	-
Sororoça (BeAr 32149)		0	-	-	-	-	-
Iaco (BeAr 31206)		0	-	-	-	-	-

- not tested

* log Neutralization Index

TABLE 3

Results of mice N tests with Tucunduba (strain SPAn 28719) and selected Bunyamwera serogroup

Immune serum	Virus*	
	SPAn	BeAr
	28719	278
SPAn 28719	3.0	3.5
Tucunduba (BeAr 278)	2.6	4.0
Wyeomyia (original)	2.6	4.3
Taiassui (BeAr 671)	1.6	0.4
Macaua (BeAr 306329)	1.6	1.8
Iaco (BeAr 314206)	1.6	0.7
Sororoca (BeAr 32149)	1.1	-
Kairi (BeAr 8226)	1.1	-
Anhembi (SPAr 2984)	1.6	1.5

- not tested

* log Neutralization Index

DISCUSSION

Bunyamwera complex viruses comprises viruses, subtypes or varieties of one or another virus sharing some epitopes, which are detected in one or another test depending on the set of reagents.

The suckling mouse is considered to be the universal host system for the majority of arbovirus isolations. It is noteworthy that the seven viruses isolated from sentinel mice reflect this susceptibility and suggest the probable enzootic circulation of these viruses with the participation of hematofagous arthropods on the transmission. All five MAG viruses were isolated from the same family of swiss mice, which reveals an intense dissemination of the virus in the studied area. However, human infections have not been detected at the same time in this site.

Except for Tucunduba virus, which was found in the rising region of Guaratuba river in Bertioiga county (23°55' S, 46°05' W), the other isolations occurred in the region of Icapara, Iguape county. These two studied areas are situated in the coastal region with a very peculiar vegetation, with predominance of mangrove and sandbank. Despite so many similar environments, these viruses have not been detected in later studies done by SAVT in different sites of São Paulo State, suggesting that Tucunduba virus is restricted to Guaratuba region, while MAG and KRI viruses, to Icapara area.

Two of the MAG virus presented hemagglutinin in pH 6.1 while the other ones after subsequent passages in suckling mice have not showed hemagglutination activity. Thus, those two strains are not included within seroepidemiological surveys of the areas of research, where the surveillance program to arbovirus has been developed, because it is difficult to maintain the hemagglutination activity of those two strains. For this reason, possible human and wild animal infections have not been detected. In 1996, two more strains of MAG virus obtained from blood of birds *Zonotrichia capensis* and *Crotophaga ani* (Santos, unpublished data), in the region of Icapara, demonstrate the existence of a restricted enzootic circulation of the virus in this area. As migratory birds are suspected to be the vertebrate hosts, it is interesting to note that the bird *Crotophaga ani* may be responsible for the geographical distribution of MAG virus since this species of bird travels great distances along South America. This fact was not observed with Tucunduba and KRI viruses suggesting that other specimens of vertebrates could be their hosts. Further research must be done to achieve better evaluation of the epidemiology of those viruses.

The isolations of MAG, KRI and Tucunduba viruses confirm the presence of these viruses in São Paulo State. In the absence of a recognized disease caused by any of these viruses in the State, further studies are necessary to define which vectors and vertebrate hosts are involved in the cycles of these agents in the area, besides serologic surveys to determine the presence of antibodies in humans and livestock.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all staff members from The Section of Arthropod-Transmitted Viruses, Adolfo Lutz Institute (A.L.I.) for their participation in the laboratory and field work. We wish to list and express our gratitude to those persons: Akemi Suzuki, Antonia T. Marti, Carlos R. Elias, Carmem L.A. Machado, Dulce M. de Souza, Edna M. Borges, Flávio O. Miguel, Fernando A.P.M Lima, João Magrini, João P. Gama, José G. Oliveira, Manoel F. Santana, Márcia C.S. e Souza, Maria Isabel T. Santos, Pedro Pollon, Raimundo N. Santos (for completing mice N), Rui Larosa e Rosangela S. Katuyama. We would like to extend particular thanks to Dr. Amélia Travassos da Rosa, Dr. Jorge Fernando Travassos da Rosa and their staff of Evandro Chagas Institute for confirming the identity of the viruses. We are also grateful to the Section of Breeding Animals of A.L.I. for their excellent contribution.

PRESENÇA DE BUNYAVIRUS (SOROGRUPO BUNYAMWERA) NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO: Sete vírus foram isolados de camundongos sentinela, expostos em área de floresta, na Região da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil, de 1974 a 1981. Estão incluídas cinco amostras de Maguari, uma de Kairi e uma de Tucunduba. Foi a primeira vez que esses vírus foram detectados no Estado de São Paulo. Os isolados foram identificados por testes sorológicos de Hemaglutinação, Inibição de Hemaglutinação, Fixação de Complemento e Neutralização em camundongos lactentes. Os resultados mostraram que esses vírus pertencem ao sorogrupo Bunyamwera. Como existem relatos de doença humana causada por vírus pertencente a esse grupo, conclui-se que é necessário estudar os aspectos ecológicos envolvendo os ciclos de manutenção desses vírus, assim como a possibilidade de sua transmissão em seres humanos no Estado de São Paulo, Brasil.

DESCRITORES: Bunyavirus, Programa de vigilância, Camundongos sentinela, Isolamento e Identificação de vírus

REFERENCES

1. CALISHER, C.H.; GUTIERREZ, E.V.; FRANCY, D.B.; ALAVA, A.A., Muth DJ, Lazuick JS: Identification of hitherto unrecognized arboviruses from Ecuador: Members of serogroup B, C, Bunyamwera, Patois, and Minatitlan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32** (4): 877-885, 1983.
2. CALISHER, C.H.; FRANCY, D.B.; SMITH, G.C.; MUTH, D.J.; LAZUICK, J.S.; KARABATSOS, N.; JAKOB, W.L.; MC LEAN, R.G. - Distribution of Bunyamwera serogroup viruses in North America, 1956-1984. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35** (2): 429-443, 1986.
3. CALISHER, C.H.; LAZUICK, J.S.; LIEB, S.; MONATH, T.P.; CASTRO, K.G. - Human infections with Tensaw virus in South Florida: Evidence that Tensaw virus subtypes stimulate the production of antibodies reactive with closely related Bunyamwera serogroup viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39** (1): 117-122, 1988.
4. CALISHER, C.H.; SABATTINI, M.S.; MONATH, T.P.; WOLFF, K.L. - Cross-neutralization tests among Cache Valley virus isolates revealing the existence of multiple subtypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39** (2): 202-205, 1988.
5. CALISHER, C.H.; ORO, B.J.G.; LORD, R.D.; SABATTINI, M.S.; KARABATSOS, N. - Kairi virus identified from a febrile horse in Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39** (5): 519-521, 1988.
6. CLARKE, D.H. & CASALS, J. - Technique for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**: 561-573, 1958.
7. DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; HERVÉ, J.P.; SÁ FILHO, G.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; RODRIGUES, S.G. - Modifications of arbovirus transmission in relation to construction of dams in Brazilian Amazonia. *Ciência e Cultura*, **44** (2/3): 124-135, 1992.
8. FULTON, F. & DUMBELL, K.R. - The serological comparison of strains of Influenza virus. *J. Gen. Microbiol.*, **3**: 97-111, 1949.
9. GONZALEZ-SCARANO, F.; NATHANSON, N. - Bunyamwera serogroup viruses. In BM Fields, DM Knipe, PM Howley et al (ed). Lippcott-Raven Publishers: *Virology, Philadelphia Third Edition*, vol 1 p. 1473-1504, 1996.
10. IVERSSON, L.B.; SILVA, R.A.M.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; BARROS, L.R.S. - Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilheus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **35** (4): 335-359, 1993.
11. KARABATSOS, N. - International Catalogue of Arboviruses including other viruses of vertebrates ed. 3. San Antonio, USA. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985.
12. MONATH, T.P.; SABATTINI, M.S.; PAULI, R.; DAFFNER, J.F.; MITCHELL, C.J.; BOWEN, G.S.; CROPP, C.B. - Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. IV. Serologic surveys and sentinel equine program. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**: 966-975, 1985.

13. PARSON, I.; MAC PHEE, D.A. - Bunyavirus pathogenesis. *Adv. Virus Res.*, **30**: 279-316, 1985.
14. PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FREITAS, R.B.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; VASCONCELOS, P.F.C. - Arboviroses. Aspectos clínico-epidemiológicos. In: Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. *Fundação SESP*, Belém, PA, Brasil: vol 1, p. 375-408, 1986..
15. SEVER, J.L. - Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*, **8**: 320-329, 1962.
16. SHOPE, R.E. & SATHER, G.E. - Arboviruses. In: LENNETTE, E.H. & SCHIMIDT, N.J. ed: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5 ed. Baltimore, *American Public Health Association*, 767-814, 1979.
17. SMITHBURN, K.; HADDOW, A.J.; MAHAFFY, A.F. - A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki Forest. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **26**: 189-208, 1946.
18. SABATTINI, M.S.; SHOPE, R.E.; VARELLA, J.M. - Serological surveys of arboviruses in Cordoba Province, Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **14**: 1073-1078, 1965.
19. THEILER, M.- Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 380-382.1957
20. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P. - Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Ciência e Cultura*, **44** (2/3): 117-124, 1992.
21. WOODALL, J.P.; Virus research in Amazonia. *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*. **6**: 31-63, 1967

Recebido para publicação em 03/09/97

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS ÁGUAS DE FONTES MINERAIS DA REGIÃO DA GRANDE SÃO PAULO

Linda NISHIHARA*¹,
Janete ALABURDA*,
Franca Durante de MAIO*

RIALA 07/833

NISHIHARA, L.; ALABURDA, J.; MAIO, F. D. – Características Físico-Químicas das águas de fontes minerais da Região da Grande São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(2):19-25, 1998.

RESUMO: Visando avaliar a qualidade de águas minerais, foram analisadas amostras de 12 fontes minerais localizadas na Região Metropolitana da Grande São Paulo. As amostras foram coletadas trimestralmente durante o período de um ano, diretamente da fonte e submetidas à análise dos seguintes parâmetros físico-químicos: aspecto; cor; odor; turbidez; pH; alcalinidade de hidróxidos, de carbonatos e de bicarbonatos; cálcio; cloreto; dureza total; ferro; magnésio; nitrogênio amoniacal, albuminóide, nitrato e nitrito; oxigênio consumido; potássio; sódio; sulfato; arsênio; bário; cádmio; chumbo; cianeto; cobre; cromo total; fluoreto; manganês e zinco. As amostras de águas minerais apresentaram constância nos resultados dos parâmetros analisados durante o período das coletas, sendo que os valores obtidos encontraram-se de acordo com os da legislação vigente, com exceção de uma única fonte que apresentou concentrações de manganês e de nitrato acima do previsto na legislação. A faixa de concentração dos elementos metálicos mais abundantes foi de 2,8 a 19 mg/L para o sódio, 1,3 a 3,4 mg/L para o potássio, 0,6 a 14 mg/L para o cálcio e 0,8 a 11 mg/L para o magnésio. Os teores dos demais metais analisados apresentaram-se abaixo dos limites de detecção dos métodos (0,01 mg/L para Mn, Cr, Cu e Cd; 0,02 mg/L para As; 0,03 mg/L para Pb e Al), sendo que apenas o íon zinco apresentou valores de 0,01 a 0,13 mg/L, podendo-se classificar as águas analisadas como oligominerais.

DESCRITORES: Águas minerais; parâmetros físico-químicos de águas minerais; análise de águas minerais.

INTRODUÇÃO

As águas minerais, segundo a Resolução 25/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA)¹³, são definidas como águas de origem profunda não sujeitas à influência de águas superficiais, provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas, que possuem composição química ou propriedades físicas ou físico-químicas distintas das águas comuns. Poderão ser também consideradas como águas minerais, as águas de origem profunda que, mesmo sem atingir os limites da classificação estabelecidos pelos padrões vigentes, possuam comprovada propriedade favorável à saúde.

As águas minerais¹³ são classificadas quanto à sua composição química, de acordo com o elemento predominante, podendo ter classificação mista as que acusarem na sua composição mais de um elemento digno de nota.

A qualidade química destas águas é o resultado da composição original das águas meteóricas, do tipo de solo e rocha presentes na zona saturada e não saturada, tempo de circulação, clima e biota¹⁸. A sua composição química não é estática em relação ao tempo, sendo que modificações no regime de bombeamento e volumes extraídos podem causar alterações significativas na concentração salina das mesmas¹⁵.

* Instituto Adolfo Lutz - Serviço de Química Aplicada - Divisão de Bromatologia e Química - Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira Cesar - CEP 01246-902 - São Paulo - SP

(1) Pesquisador responsável para receber a correspondência: - Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Bromatologia e Química - Seção de Águas.

O consumo de água mineral no Brasil apresenta um crescimento contínuo, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. O volume de produção¹ que era em torno de 800 milhões de litros em 1989, ultrapassou a marca de 1 bilhão e meio de litros em 1995, sendo o índice médio anual de crescimento deste setor cerca de 20%. As previsões de produção²⁶ para 1997 apontam para um mínimo de 2 bilhões de litros. Dados de 1990 mostraram³⁰ 202 concessões de lavras existentes para a exploração de fontes minerais em todo o território nacional, sendo que o Estado de São Paulo é o maior produtor no País², liderando o engarrafamento de água mineral e potável de mesa.

Este crescimento no consumo de águas minerais pode estar relacionado com a poluição dos mananciais que abastecem as grandes metrópoles, constatada ou não, além de muitos consumidores considerarem que as águas minerais possuem efeitos medicinais benéficos para a saúde, especialmente para a digestão. Portanto, o conhecimento das características físico-químicas destas águas é uma informação importante para a garantia da saúde da população, uma vez que devido às ações antrópicas pode ocorrer a contaminação dos mananciais, como no caso das águas provenientes de aquíferos fraturados em rochas ultrabásicas que apresentam tendência ao enriquecimento de fluoretos e de outros materiais¹⁸.

O fluoreto pode ocorrer naturalmente em águas subterrâneas mas é classificado como um contaminante pela legislação vigente¹³, porque quando se encontra em concentrações elevadas pode ocasionar a fluorose dentária e óssea^{5,6}. Por outro lado, a presença de metais pesados em águas de consumo humano está geralmente relacionada com a contaminação dos mananciais por resíduos industriais^{5,6}. A ingestão dos mesmos pode causar sérios problemas à saúde da população^{5,6,9}, desde distúrbios gastro-intestinais até disfunção mental e motora relacionada à degeneração do sistema nervoso.

A literatura referente às águas minerais brasileiras é bem escassa, havendo poucos trabalhos publicados com o objetivo de verificar a qualidade das mesmas^{16,24,30}. Por outro lado, o Código de Águas Minerais¹¹ deve ser revisado, uma vez que permite a caracterização das águas como nitradas, toriativas ou radíferas. O nitrato, independentemente da sua origem, pode causar doenças como a metemoglobinemia em bebês^{6,10,21,23}, além da suspeita de ser precursor de compostos cancerígenos^{10,23}, por outro lado nitrogênio amoniacal pode ser indicativo de fontes de poluição próximas e de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias^{5,6,7}.

No sentido de ampliar as informações sobre o assunto, realizou-se um monitoramento das características físico-químicas das águas de fontes localizadas na Região Metropolitana da Grande São Paulo (RMGSP), cuja água mineral encontra-se disponível no mercado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 4 amostras trimestrais de 12 fontes minerais localizadas na Região Metropolitana da Grande São Paulo, no período de setembro de 1995 a novembro de 1996. As amostras foram coletadas diretamente das fontes em recipientes adequados e preservadas de acordo com os parâmetros a serem analisados⁵, conforme descrito na tabela 1. Os métodos utilizados^{3,5,19,20,28} nas determinações estão apresentados resumidamente nas tabelas 2 e 3, bem como os valores máximos permissíveis (VMP) previstos na legislação¹³. Foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro Hach — DR 2000; espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer 3110 e fotômetro de chama Evans.

Para a análise de metais, as amostras acidificadas foram previamente digeridas^{5,20} antes do procedimento ana-

TABELA 1

Condições de coleta e preservação das amostras de águas de acordo com o parâmetro a ser analisado⁵.

Parâmetro	tipo de frasco	preservação
Alcalinidade	borosilicato	4°C
Amônia e Nitrogênio albuminóide	borosilicato	4°C e pH<2(H ₂ SO ₄)
Arsênio	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Bário	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Cádmio	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Chumbo	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Cianeto	polietileno	pH>12(NaOH)-4°C
Cloretos	borosilicato	4°C
Cromo total	polietileno	pH<2(HNO ₃)-4°C
Cobre	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Cor	borosilicato	-
Dureza total	borosilicato	pH < 2(HNO ₃)
Ferro total	polietileno	pH<2 (HNO ₃)-Tamb
Fluoreto	polietileno	-
Manganês	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Nitrato	borosilicato	4°C
Nitrito	borosilicato	4°C
Oxigênio consumido	borosilicato	- *
pH	borosilicato	- *
Potássio	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb
Sódio	polietileno	-
Sulfato	borosilicato	4°C
TDS	borosilicato	4°C
Turbidez	borosilicato	proteção da luz - 4°C
Zinco	polietileno	pH<2(HNO ₃)-Tamb

* A análise deve ser realizada imediatamente após a coleta

TABELA 2
Parâmetros físico-químicos e íons característicos avaliados nas amostras de águas, métodos analíticos utilizados^{3,5,19,20,28} e o valor máximo permissível (VMP) segundo a legislação vigente¹³.

Parâmetro	método utilizado	VMP ^a
Alcalinidade	volumetria de neutralização reagente: H ₂ SO ₄ ; indicadores: fenolftaleína e alaranjando de metila (± 1,7 mg/L)	0 (devido à hidróxidos)
Amônia e Nitrogênio albuminóide	espectrofotométrico (λ = 450nm)	0,03 mgN/L
Cloreto	destilação/reagente de Nessler (0,02 mg/L)	0,05 mgN/L
Cor	volumetria de precipitação método de Mohr (± 0,4 mg/L)	100 mg/L
Dureza total	espectrofotométrico (λ = 455nm)	5 uH
Ferro total	volumetria de complexação Reagente: EDTA e indicador Eriocromo preto T (± 1,3 mg/L)	- ^b
Nitrato	espectrofotométrico (λ = 510 nm) reagente: o-fenantrolina (± 0,03 mg/L)	- ^b
Nitrito	espectrofotométrico (λ = 400 nm) reagente: ácido fenoldissulfônico (± 0,05 mg/L)	1,3 mgN/L
Oxigênio consumido	espectrofotométrico (λ = 520nm) reagente: ácido sulfanílico (± 0,002 mg/L)	ausente
pH	permanganométrico	3,5 mg/L
Potássio	potenciométrico	4,0-9,0
Sódio	fotometria de chama	-b
Sulfato	fotometria de chama	-b
TDS	espectrofotométrico (λ = 450nm)	-b
Turbidez	reação com íons Ba ²⁺ (± 2,2 mg/L) condutométrico	-
	turbidimétrico	3 uT

^a Valor máximo permissível segundo a legislação vigente, Resolução 25/76 da CNNPA, Portaria 14 Bsb de 12/01/77

^b parâmetros que não tem valor máximo permissível, porém são importantes para classificação das águas minerais.

TABELA 3
Contaminantes inorgânicos avaliados nas amostras de águas, métodos analíticos utilizados^{3,5,19,20,28} e valor máximo permissível (VMP) segundo a legislação vigente¹³.

Parâmetro	método utilizado	VMP ^a
Arsênio	formação de arsina e reação com iodeto de mercúrio (± 0,01 mg/L)	0,05 mg/L
Bário	espectrofotométrico (λ = 450nm)	1,0 mg/L
Cádmio	reação com íons SO ₄ ²⁻ (± 2,2 mg/L)	0,01 mg/L
Chumbo	absorção atômica com chama	0,05 mg/L
Cianeto	absorção atômica com chama espectrofotométrico (λ = 612 nm)	0,2 mg/L
Cromo total	reagente: piridina-pirazolone (± 0,004 mg/L) ou eletrodo íon seletivo	0,05 mg/L
Cobre	espectrofotométrico (λ = 540 nm) reagente: 1,5-difenilcarbohidrazida (± 0,025mg/L)	1,0 mg/L
Fluoreto	espectrofotométrico (λ = 560 nm) reagente: ácido bicintronítrico (± 0,007 mg/L)	1,0 mg/L
Manganês	espectrofotométrico (λ = 580 nm) reagente: SPADNS ou eletrodo íon seletivo	0,05 mg/L
Zinco	espectrofotométrico (λ = 560 nm) reagente: PAN (± 0,0049 mg/L)	5,0 mg/L
	espectrofotométrico (λ = 620nm) reagente: zincon (± 0,008 mg/L)	

^a Valor máximo permissível segundo a legislação vigente, Resolução 25/76 da CNNPA, Portaria 14 Bsb de 12/01/77

lítico, sendo que para as determinações de arsênio, sulfato e bário as amostras foram concentradas 10 vezes, enquanto que para cádmio e chumbo 20 vezes. Foram realizados testes qualitativos prévios^{4,8} para o sulfato e o bário numa porção da amostra acidificada e pré-concentrada, utilizando-se solução aquosa de cloreto de bário a 10% para o sulfato e solução aquosa de sulfato de sódio a 10% para o bário, sendo que o limite de detecção para ambos os íons é de 0,5 mg/L. Quando o teste prévio acusou turvação, procedeu-se à análise quantitativa da amostra.

Todas as determinações foram acompanhadas de um branco preparado de forma similar à amostra, utilizando-se água destilada e deionizada.

RESULTADOS

Os resultados das análises das amostras das águas minerais, provenientes diretamente das fontes, são apresentados nas tabelas 4 e 5, expressos em mg/L. Os valores apresentados na tabela 4 correspondem aos parâmetros físico-químicos e íons característicos e na tabela 5 aos contaminantes inorgânicos. Os valores apresentados correspondem à média aritmética dos resultados das amostragens realizadas trimestralmente, uma vez que as medidas de cada parâmetro não diferiram em mais que 10% dos valores destas médias.

DISCUSSÃO

Os resultados relacionados nas tabelas 4 e 5 correspondem a composição físico-química das águas minerais colhidas diretamente da fonte. Desse modo, evitou-se possíveis alterações decorrentes da etapa de engarrafamento²⁷, bem como, do próprio armazenamento das águas engarrafadas^{17,22,29}.

Os resultados apresentados com relação aos parâmetros organolépticos foram adequados aos padrões de água mineral, sendo que os mesmos foram bastante inferiores aos valores máximos permissíveis¹³ para a cor (5uH) e para a turbidez (3 uT). Ainda para a maioria das amostras analisadas (75%) a cor não foi detectada, isto é, os valores medidos foram equivalentes a zero uH. Quanto ao aspecto todas as amostras apresentaram-se límpidas, sendo também observada a ausência de odor. Estas características são facilmente perceptíveis, sendo importantes para uma avaliação prévia do produto no momento do seu consumo. Os resultados observados também indicam que as fontes amostradas apresentaram condições adequadas de proteção do manancial e de captação.

Os valores de pH das amostras analisadas apresentaram-se próximos da neutralidade, verificando-se que a alcali-

linidade das amostras é devida somente à presença de bicarbonatos. Quanto aos resultados encontrados para a dureza total, observa-se também teores relativamente baixos, os quais seguem as reduzidas concentrações detectadas de cálcio (0,6 a 14 mg/L) e de magnésio (0,8 a 11 mg/L).

Os íons cloreto, ferro, potássio, sódio e sulfato que geralmente ocorrem de forma natural nas águas minerais devido às características geológicas da região em que a fonte está localizada¹⁸, também se apresentaram em quantidades relativamente baixas. Resultados semelhantes também foram observados para os contaminantes inorgânicos cianeto e arsênio. Quanto ao teor de oxigênio consumido, que está relacionado indiretamente com a matéria orgânica presente e com o grau de oxidação da água⁷, os valores obtidos estão na faixa de 0,2 a 0,5 mg/L de oxigênio e foi detectado em todas as amostras analisadas, indicando um teor relativamente pequeno de substâncias redutoras presentes nas amostras.

Com relação a presença de compostos de nitrogênio, somente foi observada a ocorrência de nitratos em 10 (83 %) das 12 fontes analisadas, sendo que nitrogênio amoniacal e albuminóide e nitrito sempre estiveram ausentes. A legislação vigente¹⁴ estabelece como concentração limite para o nitrogênio nítrico 1,1 mg N-NO₃/L, sendo que poderá ser tolerada a presença de até 4,5 mg N-NO₃/L no caso de exame bacteriológico satisfatório. Desta forma, com base nos resultados da tabela 4, somente uma das fontes analisadas apresentou teor médio de nitrato igual a 6,0 mg N-NO₃/L, o qual está em desacordo com a legislação, enquanto que para as duas fontes que apresentaram concentrações médias iguais a 3,2 e 3,5 mg N-NO₃/L são necessárias informações adicionais para a sua avaliação.

A maior concentração de fluoreto obtida foi de 0,30 mg/L, estando este valor abaixo do limite máximo permissível para as águas minerais (1,0 mg/L) ou da faixa recomendada para as águas de abastecimento^{12,25} (0,6 a 0,8 mg/L) para fins de prevenção da cárie dentária.

Dos metais analisados, apenas o zinco e o manganês foram detectados, enquanto que o bário, cádmio, chumbo, cobre e crômio foram encontrados em concentrações abaixo do limite de detecção do método analítico⁵. No caso do manganês, somente uma fonte apresentou concentração acima do limite de detecção do método, observando-se um teor de 0,14 mg/L que está em desacordo com o limite estabelecido pela legislação¹³. Convém salientar, que este valor limite para o manganês está relacionado com questões de ordem estética, isto é, com as propriedades organolépticas e não com efeitos adversos à saúde humana^{6,7,9}. Ainda, é importante ressaltar que esta fonte com teor elevado de manganês também apresentou teor de nitrato acima do valor máximo permissível pela Resolução 05/78¹⁴.

TABELA 4
Parâmetros físico-químicos e dos íons característicos das amostras de águas minerais. Valores médios das amostragens trimestrais.

Parâmetro	fontes											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Alcalinidade:												
hidróxido (mg/L CaCO ₃)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
carbonato (mg/L CaCO ₃)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bicarbonato(mg/L CaCO ₃)	68	15	12	18	10	23	12	15	13	37	20	11
Aspecto	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Cálcio (mg/L)	14	0,6	2,4	2,4	4,3	3,6	1,6	2,1	2,0	8,0	4,8	2,4
Cloreto (mg/L)	6,0	7,0	15	6,0	14	5,0	5,5	7,0	6,5	6,7	8,0	9,5
Cor (uH)	0	0	0	0	0	0	≤3	≤2	0	0	≤2	0
Dureza total(mg/L CaCO ₃)	40	19	44	33	37	18	26	19	18	37	33	27
Ferro total (mg/L)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Magnésio (mg/L)	0,9	1,5	1,7	4,3	3,4	1,7	1,6	2,9	0,8	11	3,7	2,4
NH ₃ amoniacal (mg/L N)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NH ₃ albuminoide (mg/L N)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrito (mg/L N)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrato (mg/L N)	nd	0,3	6,0	0,2	1,0	0,7	nd	0,4	0,2	0,1	3,5	3,2
Odor	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
Oxigênio consumido(mg/L)	0,5	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
	7,2	6,0	5,1	6,2	5,7	5,5	5,8	5,9	5,7	6,7	5,3	5,5
pH	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	7,6	6,3	5,8	6,3	6,2	6,1	6,7	6,3	5,9	6,9	6,1	5,8
Potássio (mg/L)	1,8	1,6	3,4	1,5	2,6	2,3	1,3	1,3	1,4	3,0	2,0	2,2
Sódio (mg/L)	19	3,8	16	3,7	8,9	4,7	3,0	3,6	2,8	5,6	6,6	6,6
Sulfato (mg/L)	4,0	nd	1,4	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	2,1	nd	1,8
TDS (mg/L NaCl)	76	18	62	25	46	35	19	23	15	45	46	38
Turbidez (uT)	≤ 0,3	0,2	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,6

L = límpido; nd = não detectado; aus = ausente

TABELA 5
Teores dos contaminantes inorgânicos nas amostras de águas minerais. Valores médios (em mg/L) das amostragens trimestrais.

Parâmetro	fontes											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
As	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Ba	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cd	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Pb	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
CN	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Cu	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Cr total	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
F	0,30	0,06	0,11	0,11	0,06	0,08	0,03	0,10	0,03	0,18	0,08	0,14
Mn	<0,01	<0,01	0,14	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Zn	0,08	0,04	0,01	0,05	0,13	0,06	0,07	0,04	0,05	0,05	0,06	0,02

A partir dos resultados experimentais das amostras de águas minerais analisadas verificou-se a presença de concentrações bastante reduzidas dos íons normalmente presentes na sua composição, fato que também está de acordo com os valores obtidos na análise dos sólidos totais dissolvidos (TDS), os quais situaram-se na faixa de 15 a 76 mg/L.

CONCLUSÃO

As amostras de águas provenientes das fontes minerais apresentaram composição química dentro dos limi-

tes permitidos pela legislação, com exceção de uma única fonte que apresentou concentração de manganês de 0,14 mg/L e de nitrato de 6,0 mg N-NO₃/L, parâmetros que estão em desacordo com a legislação vigente para as águas minerais.

De forma geral, as amostras de águas minerais analisadas apresentaram boa qualidade, quanto aos parâmetros físico-químicos estudados. Como essas amostras não apresentaram nenhum íon em teores que as incluíssem em uma classificação especial, as águas minerais analisadas podem ser classificadas como oligominerais.

NISHIHARA, L.; ALABURDA, J.; MAIO, F. D. - Physico-chemical characteristics of water from mineral sources of São Paulo metropolitan region. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2):19-25, 1998.

ABSTRACT: Studies were conducted to evaluate the water quality from twelve mineral sources located in Metropolitan Region of São Paulo. The samples were collected trimestrially during one year and were submitted to physico-chemical measurements. Data are presented for aspect; color; odour; turbidity; pH; alkalinity; calcium; magnesium; total hardness; chloride; iron; ammonia and albuminoid nitrogen; nitrite; nitrate; consumed oxygen; potassium; sodium; sulphate; arsenium; barium; cadmium; lead; cyanide; copper; chromium; fluoride; manganese; zinc and total dissolved solids. The observed values for each one of these parameters were similar during the studied period. Most of the sources agree with the requirements of the Federal Brazilian Regulations, despite one of them exceeded the maximum contaminant levels for manganese and nitrate. The concentration ranges for some of the common metallic elements were 2,8 to 19 mg/L for Na; 1,3 to 3,4 mg/L for K; 0,6 to 14 mg/L for Ca and 0,8 to 11 mg/L for Mg. The other metallic elements were below the limit established by the Brazilian legislation, with the exception of manganese in one sample. The physico-chemical parameters as pH, color, turbidity, alkalinity and odour were within the established values by Brazilian legislation. The mineral water of the sources may be classified as oligo mineral.

DESCRIPTORS: Mineral water; physico-chemical parameters of mineral water; mineral water analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABINAM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ÁGUAS MINERAIS - Rumo aos dois bilhões de litros, *Revista Água*, Belver Editorial, São Paulo, 9-12, 1997.
2. ABINAM/DNPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ÁGUAS MINERAIS E DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, *Água Mineral no Brasil: Retrato Histórico da Indústria Engarrafadora*, Ed. Arte & Ciência, São Paulo, 1996.
3. ADAMS, V.D. - *Water & Wastewater Examination Manual*, 1a ed, Lewis Publishers, Michigan, 1991, p. 247.
4. ALEXÉEV, V. - *Análise Quantitativa*, 1a ed., Editora Lopes da Silva Porto, Lisboa, 164-167, 1972.
5. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17a ed., Washington, 1-1/1-8 e 4-75/4-93, 1992.
6. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) - *Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies*, McGraw Hill, 4a ed., USA, 1990, p.1194.
7. AZEVEDO NETTO, J. M. - *Técnica de abastecimento e tratamento de água, volume I: abastecimento de água*, CETESB/ASCETESB, 3a ed., São Paulo, 1987, p. 332.

8. BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.S. - *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 2a ed., Editora Edgar Blucher Ltda, São Paulo, 165-167, 1992.
9. BEAN, E.L. - Potable Water - Quality Goals, *J. Am. Water Works Associ.*, Denver, 221-230, 1974.
10. BOUCHARD, D.C.; WILLIAMS, M.K.; SURAMPALLI, R.Y. - Nitrate Contamination of Ground Water: Sources and Potential Health Effects, *J. Am. Water Works Associ.*, Denver, 85-90, 1992.
11. BRASIL. Leis, Decretos, etc. Código de Águas Minerais, Decreto Lei nº 7.841, 08.08.45. *Diário Oficial*, 20 de agosto de 1945, p. 194.
12. BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 36, de 19.01.90. *Diário Oficial*, Brasília, 23 jan. 1990, Seção I p. 1651-1654. O Ministério da Saúde aprova normas e padrões de potabilidade de água destinada ao consumo humano.
13. BRASIL. Ministério da Saúde - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (C.N.N.P.A.) - Resolução nº 25/76, *Diário Oficial*, 03 de fevereiro de 1977.
14. BRASIL. Ministério da Saúde - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (C.N.N.P.A.) - Resolução nº 05/78, *Diário Oficial*, Seção 1, p. 10979, 14 de julho de 1978.
15. DOMENICO, P.; SCHWARTZ, F. - *Physical and Chemical Hydrogeology*, John Wiley & Sons, New York, 1990, p. 824.
16. FRANCO, F.C.; MALTZ, M. - A concentração de fluoretos em águas minerais, chás brasileiros e chimarrão. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas, 8, Águas de São Pedro, São Paulo, 1991, *Anais*, p.4
17. GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F. — Analysis of the interactions between autochthonous bacteria and packaging material in PVC - bottled mineral water, *Microb. Res.*, **149**(2): 115-122, 1994.
18. HIRATA, R. - Qualidade das águas subterrâneas e das águas minerais. In: Simpósio de Águas Subterrâneas - A alternativa eficaz para o suprimento de água industrial no presente e no futuro, São Paulo, *Anais*, Cetesb, 1995.
19. HUMP, H.H.; KIRST, H. - *Laboratory Manual for the Examination of Water, Wastewater and Soil*, 2a ed., V.C.H., New York, 1992, p 190.
20. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, volume I: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. IMESP, 3a ed., São Paulo, 313-319, 1985.
21. MATO, A.P. - Determinação de Nitratos, Nitritos e prováveis fontes de contaminação em águas de poços e sua influência na metemoglobinemia infantil. São Paulo, 1996 [Dissertação de Mestrado — Curso de Pós- Graduação em Saneamento Ambiental, Universidade Mackenzie].
22. MONARCA, S.; FUSCO, R.; BISCARDI, D.; FEO, V.; PASQUINI, R.; FATIZONI, C.; MORETTI, M.; ZANARDINI, A. - Studies of migration of potentially genotoxic compounds into water stored in PET bottles, *Food Chem. Toxic.*, **32**(9): 783-788, 1994.
23. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - *Nitratos, nitritos and N-nitroso compounds*, Geneva, 1978, p. 107.
24. PEDRO, N.A.R.; FREITAS, V.P.S.; BADOLATO, M.I.C.; OLIVEIRA, E. - Determinação de Metais em Águas Minerais na Região de Campinas, Estado de São Paulo, *Química Nova*, **14**(4): 108-109, 1991.
25. SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução SS-250, 15.08.95, *Diário Oficial do Estado*, seção 1, p. 11.
26. SIMÕES, R.A.P. - Análise do Mercado de águas minerais e suas tendências, *Engarrafador Moderno*, Aden Editora e Comunicações Ltda., 13-26, 1997.
27. STEINER, I.; KREIS, G.; WASHETTL, J. - Food hygienic investigations in a mineral water bottling plant, *Ernaehrung*, **19**(7/8): 321-324, 1995.
28. THEROUX, F.R.; ELDRIDGE, E.F.; MALLMANN, W. LEROY - *Laboratory Manual for Chemical and Bacterial analysis of Water and Sewage*, 3a ed., McGraw Hill, New York, 1943, p. 273.
29. VESTUCCI, G.; FAVA, P.; TINELLI, L. - Container barrier properties and physicochemical characteristics of mineral water. Preliminary study on the interaction, *Rassegna dell' Òmballaggio-e-Confezionamento*, **17**(2): 6-8, 1996.
30. VILLENA, R.S.; BORGES, D.G.; CURY, J.A. - Avaliação da concentração de flúor em águas minerais comercializadas no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **30**(6): 512-518, 1996.

Recebido para publicação em 19/12/97

IGA1 PROTEASES — OCORRÊNCIA EM AGENTES ETIOLÓGICOS DE MENINGITE

Ilka Maria LANDGRAF *
Maria das Graças Adelino ALKMIN **
Sônia França Correia BARBOSA **

RIALA 07/834

LANDGRAF, I.M.; ALKMIN, M.G.A. & BARBOSA, S.F.C. — IgA1 proteases — Ocorrência em agentes etiológicos de meningite. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 27-30, 1998.

RESUMO: Dentre os fatores de virulência em bactérias investigados na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, tem sido avaliada a ocorrência de proteases à imunoglobulina A (IgA1 proteases) em agentes etiológicos de meningite. Estas enzimas extracelulares são produzidas por diferentes patógenos de mucosa, incluindo os três principais agentes das meningites bacterianas: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. IgA1 proteases foram detectadas por imunoelektroforese em 28 de 39 cepas estudadas, bactérias e leveduras. Com exceção de 7 bactérias obtidas de coleção de cultura, todos os microrganismos foram isolados de líquido cefalorraquidiano. Nos três agentes etiológicos mais frequentes de meningite foi observada a presença de IgA1 proteases, como também em quatro outras bactérias, das quais duas de coleção, e não citadas na literatura como produtoras destas enzimas.

DESCRITORES: IgA1 proteases, meningite, fatores de virulência.

INTRODUÇÃO

Muitas bactérias podem produzir uma infecção meníngea, sendo mais prevalentes *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* ⁷.

Estes agentes atuam por vários mecanismos de virulência, sendo que a produção de IgA1 proteases tem sido bastante estudada ^{4,12,14}.

As IgA1 proteases são enzimas extracelulares que clivam a imunoglobulina A1 na região da dobradiça da cadeia pesada, liberando fragmentos intactos de Fab e Fc. Esta clivagem ocorre na subclasse IgA1 do soro, mas não na subclasse IgA2 ⁵. A IgA secretora (IgAs) é a principal defesa humoral da superfície da mucosa e raramente suscetível à digestão por IgA1 proteases. A não suscetibilidade relativa pode ser explicada pela presença de uma maior proporção de IgA2 na IgA secretora do que na IgA do soro ¹². Foi observado por imunoelektroforese que os fragmentos Fab e Fc liberados pela ação de proteases diferem conforme o substrato. A clivagem de

IgA1 por estas enzimas resulta numa considerável perda da atividade do anticorpo, representando, desta forma, um importante fator de virulência ^{5,9}.

A presença de IgA1 proteases foi demonstrada em líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com infecção meníngea por *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* ¹²; em líquido pleural ⁶; na saliva humana, atividade enzimática esta semelhante à observada no *Streptococcus sanguis* isolado de saliva ¹³; em suspensões de placa dentária de humanos ¹³; no lavado vaginal de mulheres com infecção por *N. gonorrhoeae* ¹; em sobrenadante, livre de células, das fezes de pessoas sãs ¹¹.

Espécies bacterianas que possuem esta atividade estão associadas a grupos distintos de doenças infecciosas e não são mutuamente relacionadas por critérios taxonômicos. Elas incluem os três agentes etiológicos principais de meningites bacterianas, e outras como *H. aegyptius* (Febre Purpúrica Brasileira e conjuntivite epidêmica), *N. gonorrhoeae* (gonorréia), bactérias envolvidas em doença periodontal destrutiva, e algumas que também atacam ou têm as membranas mucosas como

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

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

porta de entrada (*Porphiromonas*, *Capnocytophaga*, *Gemella*, *Ureaplasma*)^{4,10,12}.

A incapacidade de causar a degradação proteolítica da IgA1 humana foi observada em algumas espécies comensais de *Neisseria* (*cinerea*, *flava*, *flavescens*, *perflava*, *subflava*, *lactamica*, *mucosa*, *sicca*), de espécies de *Haemophilus*, algumas delas de baixo poder patogênico (*aphrophilus*, *ducrey*, *haemoliticus*, *parainfluenzae*, *parahaemolyticus*, *segnis*), de cepas de *E. coli* (sorotipos: O1:K1:H7, O2:H5:, O2:K2ac:H1, O4:K12:H5, O6:K13:H1, O18ac:K1, O83:K1, O112ac:H46), *Klebsiella* (*pneumoniae*, *aerogenes*, *oxitoca*), *Salmonella* (*enteritidis*, *typhi*, *typhimurium*), *Shigella* (*boydii*, *dysenteriae*, *flexneri*, *sonnei*), *Proteus* (*mirabilis*), *Staphylococcus* (*aureus*, *epidermidis*) e *Streptococcus* (*acidominimus*, *agalactiae*, *anginosus*, *bovis*, *milleri*, *mitis*, *mutans*, *pyogenes*, *uberis*) *Listeria* (*monocytogenes*)^{3,4,8,12}. Segundo Kilian³, apenas algumas cepas de *S. mitis*, *S. sanguis*, *H. parahaemolyticus*, *H. parainfluenzae* podem produzir IgA1 protease². Em outros microrganismos como fungos ou leveduras, protozoários e vírus também não tem sido detectada a presença da enzima IgA1 protease⁴.

O objetivo deste trabalho é comprovar a presença de enzimas IgA1 proteases em agentes de meningite, pois estas enzimas, além de serem consideradas um fator de virulência em algumas bactérias patogênicas, podem ter uma potente aplicabilidade em vacinas^{2,8}.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismos

Foram investigadas, por imunoeletroforese¹⁰, 36 cepas de bactérias (*Haemophilus influenzae* -14, *Neisseria meningitidis* -5, *Streptococcus pneumoniae* -3, *Acinetobacter calcoaceticus* — 1, *Enterobacter cloacae* — 1, *Klebsiella pneumoniae* -1, *Proteus mirabilis* -2, *Listeria monocytogenes* — 2) e 3 de leveduras (*Candida albicans* — 2 e *Cryptococcus neoformans* — 1), todas isoladas de líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite. Obtidas de coleção de cultura foram estudadas também as cepas bacterianas: *Shigella flexneri* — 1, *Shigella sonnei* — 1, *H. parainfluenzae* — 1, *Streptococcus mitis* — 1, *Staphylococcus aureus* — 1, *Citrobacter freundii* -1 e *Providencia stuartii* — 1.

2. Imunoglobulina e anti-soro

A IgA foi obtida de soro de pacientes com mieloma de IgA e também de colostro, e ambos submetidos à purificação em cromatografia de coluna de jacalina¹⁶. O soro apresentou uma concentração de 7,5 mg/mL de IgA1

purificada. Coelhos foram imunizados segundo metodologia descrita¹⁰ para produção do soro anti-IgA1. Além deste anti-soro, nas reações foi utilizado também um soro anti-IgA1 de procedência Sigma (Anti-Human IgA-alfachain specific, n. I-9506), como controle.

3. Ensaio de IgA1 proteases

A metodologia empregada para pesquisar a presença da IgA1 proteases foi baseada na descrita por Mestecky & Kilian¹⁰.

Inóculos abundantes obtidos através de uma alça bacteriológica bem carregada de culturas recentes (18-24 horas) das cepas em estudo, foram acrescentados em 40mL de IgA1 purificado e incubados a 37°C por 18-24 horas. O conjunto IgA1 e cultura foi a seguir centrifugado a 2.000 rpm (rotações por minuto), durante 10 minutos e o sobrenadante mantido a -20°C até o momento do teste. A imunoeletroforese foi realizada, a seguir, a fim de se caracterizar a digestão da IgA1 nas frações Fab e Fc, empregando-se anti-soro de coelho anti-IgA não absorvido e o soro anti-IgA comercial.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as bactérias e leveduras nas quais a presença ou ausência de enzimas IgA1 proteases foi observada.

TABELA 1
Positividade de IgA1 proteases em
39 microrganismos estudados

Microrganismos	Origem	Nº Estudado	Nº Positivo (%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	LCR ¹	14	14 (100)
<i>Neisseria meningitidis</i>	LCR	5	5 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	LCR	3	3 (100)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	LCR	1	1 (100)
<i>Enterobacter cloacae</i>	LCR	1	1 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LCR	1	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	LCR	2	2 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i>	LCR	2	0 (0)

TABELA 1 (continuação)
Positividade de IgA1 proteases em
39 microrganismos estudados

Microrganismos	Origem	Nº Estudado	Nº Positivo (%)
<i>Shigella flexneri</i>	Fezes	1	1 (100)
<i>Shigella sonnei</i>	Fezes	1	1 (100)
<i>H. parainfluenzae</i>	Oro-faringe	1	0 (0)
<i>Streptococcus mitis</i>	Placa dentária	1	0 (0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P	1	0 (0)
<i>Citrobacter freundii</i>	Fezes	1	0 (0)
<i>Providencia stuartii</i>	Fezes	1	0 (0)
<i>Candida albicans</i>	LCR	2	0 (0)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR	1	0 (0)
TOTAL		39	28 (72)

¹ LCR = Líquido cefalorraquidiano

DISCUSSÃO

O sistema imune de mucosa desempenha um papel importante como barreira da extensa área superficial dos tratos respiratório, gastrointestinal e geniturinário ($.400m^2$). Por outro lado, a imunoglobulina A (IgA), o principal isótipo das mucosas e secreções, é superior aos outros isótipos de imunoglobulinas na proteção contra vírus e patógenos de mucosas. Portanto, a IgA secretora (IgAs) é o principal mediador de imunidade específica das superfícies de mucosa humana ⁵.

Seres humanos, chimpanzés e gorilas expressam duas subclasses de IgA, ou seja, IgA1 e IgA2. A IgA1 é protegida contra enzimas proteolíticas por possuir, na região da dobradiça da cadeia pesada, uma seqüência dupla incomum de 13 aminoácidos, prolinas serinas e treoleínas, e por apresentar uma glicosilação de resíduos de serina. Contudo, um número de importantes patógenos bacterianos de mucosa e membros bem sucedidos da flora comensal humana, mas que podem estar associados com distúrbios patológicos, desenvolveram proteases extremamente específicas que clivam a IgA1 humana ⁵.

Tanto a IgA sérica obtida de soro de paciente com mieloma, como a IgA secretora de colostro foram utilizadas como substrato. A análise qualitativa do colostro para a presença de subclasses de IgA1 e IgA2 pelo teste de suscetibilidade à clivagem por IgA1 proteases revelou

que a IgA obtida de colostro não foi clivada. Além de possuir IgA1 em quantidades menores do que IgA2, o colostro contém anticorpos neutralizantes à maioria das IgA1 proteases bacterianas. Consequentemente, IgAs purificada de colostro humano é resistente à maioria das IgA1 proteases, a menos que seja acrescentada em quantidades excessivas ⁵.

Nossos resultados foram compatíveis com os de outros autores quanto aos agentes mais frequentes das meningites bacterianas, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, e *S. pneumoniae*. Com relação a outros agentes desta infecção, alguns apresentaram enzimas IgA1 proteases, embora na literatura tenham sido citados como não produtores destas enzimas, como *Proteus mirabilis*¹⁰. Outras bactérias de coleção, como *Shigella flexneri* e *S. sonnei*, também não citadas na literatura como apresentando estas enzimas ^{4,10,12}, foram positivas em nosso trabalho. Atribuímos estes resultados divergentes a uma concentração maior de inóculo, pois em alguns ensaios duplicados da mesma bactéria, resultados diferentes foram obtidos, como ocorreu ao se testar cepas de *S. pneumoniae*. Colônias de *S. pneumoniae*, como de outros estreptococos, são muito pequenas e se não for conseguido uma alçada bem carregada de inóculo, o resultado pode ser negativo. Alguns autores observaram que em *S. mitis* e *S. sanguis*, e em *H. parainfluenzae* apenas algumas cepas desenvolvem esta enzima ⁵.

De acordo com Lomholt ⁸, a IgA1 se constitui em um antígeno comum e merece avaliação futura para uma possível aplicação em vacinas a fim de prevenir doenças causadas pelo microrganismo produtor da enzima. Este mesmo autor afirma que ainda existe muito para ser aprendido sobre a função molecular das IgA1 proteases bacterianas e o papel que elas desempenham durante a colonização e infecção.

A presença de IgA1 proteases poderá ajudar a entender propriedades do hospedeiro e do microrganismo. Estas propriedades, quando combinadas formam a base para infecção, e esta informação tem importância clínica e pode contribuir no controle da doença ¹⁵.

Tendo em conta que estas enzimas são elaboradas somente por bactérias e não por outros microrganismos, em estudos futuros será analisada a presença destas enzimas em fluidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano, visando reduzir a grande porcentagem de meningites definidas como indeterminadas, quando pelas técnicas de identificação atualmente em desenvolvimento, não se detecta um agente bacteriano, principalmente devido ao uso prévio de antibióticos que muitas vezes inviabilizam o diagnóstico laboratorial da infecção.

LANDGRAF, I.M.; ALKMIN, M.G.A. & BARBOSA, S.F.C. — IgA1 Proteases — Occurrence in Meningitis Etiological Agents. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(2):27-30, 1998.

ABSTRACT: Among virulence factors in bacteria investigated in the Seção de Bacteriologia of the Instituto Adolfo Lutz, the occurrence of immunoglobulin A proteases (IgA 1 proteases) has been evaluated. These extracellular enzymes are produced by different mucosal pathogens, including the three major agents of bacterial meningitis: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. IgA1 proteases were detected by immunoelectrophoresis in 28 of 39 strains studied, bacteria and yeasts. Except for 7 bacteria from collection, all organisms were isolated from cerebrospinal fluid. In the three most frequent etiological agents of meningitis, IgA1 proteases were observed, as well as in four other bacteria, two of which from collection, and not cited in the literature as enzyme producers.

DESCRIPTORS: IgA1 proteases, meningitis, virulence factors.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. BLAKE, M.; HOLMES, K.K. & SWANSON, J. — Studies on gonococcus infection. XVII. IgA1-cleaving protease in vaginal washings from women with gonorrhoea. *J. Inf. Dis.* **139**: 89-92, 1979.
2. KILIAN, M.; MESTECKY, J. & SCHROHENLOHER, R.E. — Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobuline A1 protease. *Infect. immunol.*, **26(1)**: 143-149, 1979.
3. KILIAN, M., THOMSEN, B., PETERSEN, T.E. & BLEEG, H. — Molecular biology of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. *Mol. Immunol.*, **20**: 1051-1058, 1983.
4. KILIAN, M., THOMSEN, B., PETERSEN, T.E. & BLEEG, H. — Occurrence and nature of bacterial IgA proteases. *Ann. New York Acad. Sc.*, **409**: 612-624, 1983.
5. KILIAN, M.; REINHOLDT, J.; LOMHOLT, H.; POULSEN, K. & FRANDBSEN, E.V.G. - Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*, **104**: 321-338, 1996.
6. INSEL, R.A.; ALLEN, P.Z & BERKOWITZ, I.D. — Types and frequency of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. In: Seminars in infectious Diseases, vol. 4, Weinstein, L & Fields, B.N., eds., Grune & Stratton, New York, 1982, p. 225.
7. LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. — Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* from patients with meningitis in the City of São Paulo, Brazil. *J. clin. Microbiol.*, **31**: 743-745, 1993.
8. LOMHOLT, H. — Molecular biology and vaccine aspects of bacterial immunoglobulin A1 proteases. *APMIS Suppl.* **62**, **1104**: 5-28, 1996.
9. MANSA, B. & KILIAN, M. — Retained antigen-binding activity of Fab fragments of human monoclonal immunoglobulin A1 (IgA 1) cleaved by IgA1 protease. *Infect. Immunol.* **52**:171-174, 1986.
10. MESTECKY, J. & KILIAN, M. — Immunoglobulin A (IgA) . *Methods in Enzymology*, **116**:37-75, 1985.
11. MEHTA, S.K.; PLAUT, A.G.; CALVANICO, N.J. & TOMASI, Jr, T.H. — Human immunoglobuline A: production of an Fc fragment by an enteric microbial proteolytic enzyme. *J. Immunol.* **111**: 1274, 1973.
12. MULKS, M.H. — Microbial IgA proteases. In: Microbial Enzymes and Virulence. Holder, I.A., ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, p. 81-104.
13. PLAUT, A.G.; GENCO, R.J. & TOMASI, Jr, T.B. — Isolation of an enzyme from *Streptococcus sanguis* which specifically cleaves IgA. *J. Immunol.* **113**: 289-291, 1974.
14. PLAUT, A.G. — Microbial IgA proteases. *N. Engl. J. Med.* **298**: 1459-1463, 1978.
15. PLAUT, A.G. — The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 603-622, 1983.
16. SKEA, D.L.; CHRISTOPOULOUS, P.; PLAUT, A.G. & UNDERDOWN, B.J. — Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, Jacalin. *Mol. Immunol.* **25** (1): 1- 6, 1988

Recebido para publicação em 30/12/97

PRESENÇA DE VÍRUS ENDÓGENO NA LINHAGEM CELULAR *Aedes ALBOPICTUS* CLONE C6/36 NÃO INFECTADAS

Maria Luisa BARBOSA*
Marli UEDA-ITO**
Iray Maria ROCCO***

RIALA 07/835

BARBOSA, M.L.; UEDA-ITO, M & ROCCO, I.M. — PRESENÇA DE VÍRUS ENDÓGENO NA LINHAGEM CELULAR *Aedes albopictus* CLONE C6/36 NÃO INFECTADAS. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 31-33, 1998.

RESUMO: As linhagens celulares obtidas a partir de larvas do mosquito *Aedes albopictus* apresentam-se naturalmente infectadas por vírus. O clone C6/36 dessas células, obtido por Igarashi em 1978, mostrou estar livre de vírus e tem sido usado para isolamento do vírus Dengue na maioria dos laboratórios especializados. Em nossos estudos com esse clone, após diferentes períodos de incubação, detectamos a presença de um vírus endógeno. Sobrenadante de cultura de células C6/36, após o 12o dia de repique, analisado por coloração negativa em microscopia eletrônica, revelou a presença de partículas virais sem envoltório, medindo cerca de 20 nm. Esse mesmo teste, quando realizado com células após o 2°, 6° e 10° dias de incubação, resultou negativo. As células também foram submetidas à imunofluorescência indireta utilizando anti soros para vários grupos de arbovírus. Os resultados foram negativos, descartando a possibilidade de contaminação laboratorial. A presença de vírus endógeno em células C6/36 pode ocorrer em diferentes laboratórios, sem ser detectada. Nossos resultados mostraram que esse vírus endógeno não influencia o isolamento do vírus Dengue e a replicação das células. Em razão da ausência de dados, o emprego dessas células para isolamento de outros vírus deve ser cuidadosamente avaliado.

DESCRITORES: linhagem celular clone C6/36; vírus endógeno; dengue.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento de numerosas linhagens celulares possibilitou o avanço da pesquisa em diversas áreas, em particular a virologia. Linhagens celulares das mais diferentes origens, do homem aos insetos, são hoje obtidas com relativa facilidade. Em estudos com arbovírus, principalmente o vírus dengue, as linhagens celulares provenientes de mosquitos tiveram grande importância, pois apresentam maior sensibilidade a esse vírus que as de vertebrados sendo, ainda, de fácil crescimento e manutenção. SINGH & PAUL⁸ relataram pela primeira vez o isolamento do vírus dengue em cultura de células de *Aedes albopictus* estabelecidas por SINGH⁷. Desde então, várias linhagens celulares de diferentes mosquitos tem sido utilizadas para esse propósito. Estudos realizados com as células *Aedes albopictus* mostraram que podem apresentar-se

naturalmente infectadas por vírus (CUNNINGHAM et alii³; HIRUMI et alii⁶; BOUBLIK et alii¹). Clonagens realizadas por IGARASHI⁴, resultaram na obtenção do clone C6/36 livre de vírus, utilizado na maioria dos laboratórios que fazem isolamento do vírus Dengue.

Em estudos com o vírus Dengue, utilizando este clone, verificamos em controles negativos a presença de um vírus endógeno. Neste trabalho apresentamos alguns aspectos iniciais deste vírus e sua influência no isolamento do vírus Dengue.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

Os repiques para manutenção das células C6/36 foram feitos em tubos de ensaio e em garrafas de vidro

* Laboratório de Biologia Molecular

** Seção de Microscopia Eletrônica

*** Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos — Instituto Adolfo Lutz — São Paulo

de 250 ml, na concentração de 5×10^5 cél/ml. O crescimento foi em meio Leibovitz número 15 (L-15, SIGMA) modificado com 2,95% de "Tryptose Phosphate Broth"; Solução de aminoácidos não essenciais e 2% de L-Glutamina, reconstituído em água bidestilada, com pH ajustado com ácido clorídrico 0,1 M para 6.8 e suplementado com 10% de soro bovino fetal..

Períodos de incubação

As células foram incubadas por diferentes períodos: 2, 5, 9, 12, 14 e 16 dias à 28°C. Após cada período foram processadas para imunofluorescência e microscopia eletrônica.

Imunofluorescência indireta

As células foram removidas da parede dos tubos por agitação manual, centrifugadas a 1.500 rpm/10min., o sobrenadante desprezado, o sedimento ressuspendido em 0,1 ml de PBS e aplicado em lâminas próprias. Após secagem e fixação em acetona (-20°C/10 min.), as lâminas foram submetidas à imunofluorescência indireta, utilizando-se "pools" de fluido ascítico imuno anti alpha, flavi e bunyavírus e anti globulina total de camundongo conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (SIGMA).

Preparação das células para microscopia eletrônica

As células das garrafas foram rompidas por uma série de três congelamentos e descongelamentos rápidos e centrifugadas a 10.000 rpm/15min., em rotor 325 centrífuga SORVALL, para retirar os "debris" celulares. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 25.000 rpm/90 min. em rotor SW-28 em ultracentrífuga BECKMAN L-8, o sedimento foi ressuspendido em 0,5 ml de PBS e analisado em microscopia eletrônica.

Microscopia eletrônica

O sobrenadante de células foi submetido à técnica de coloração negativa com fosfotungstato de potássio (PTK) a 2%, pH 6.8 e examinado em um microscópio eletrônico Philips EM-400T, operando a 80 kV (BRENNER et alli²).

RESULTADOS

Células da linhagem *Aedes albopictus* clone C6/36 inoculadas com vírus Dengue e células controle não infectadas incubadas em condições e períodos idênticos, foram enviadas para observação ao microscópio eletrônico. A microscopia eletrônica detectou a presença de partículas virais no sobrenadante dos controles a partir do 12º dia. Essas partículas eram numerosas, esféricas, sem envoltório e medindo cerca de 20 nm de diâmetro (Fig. 1), sendo perfeitamente distintas das partículas de

Dengue que possuem envoltório e medem cerca de 50 nm de diâmetro.

Em vista da importância do achado, o procedimento foi repetido mais três vezes, observando-se em todas as análises a presença dessas partículas nas células controles. Esses mesmos dados foram obtidos em estudos realizados com o clone C6/36 proveniente de outras instituições, confirmando os resultados.

Em todos os estudos realizados com C6/36 controle, não se observou qualquer alteração celular visível, após o repique, nos diferentes períodos de incubação.

A presença do vírus endógeno no clone C6/36 aparentemente não interferiu no aparecimento do efeito citopático e isolamento de vírus, obtido a partir de soros de pacientes, com suspeita clínica de dengue, inoculados nessas células.

Os resultados obtidos após imunofluorescência com fluido ascítico imuno anti alpha, flavi e bunyavírus, realizados nas células controle foram sempre negativos, afastando desta maneira a possibilidade de qualquer contaminação acidental pelos arbovírus manipulados no laboratório.

DISCUSSÃO

As linhagens celulares provenientes de mosquitos, são geralmente derivadas de um grupo de larvas, sendo

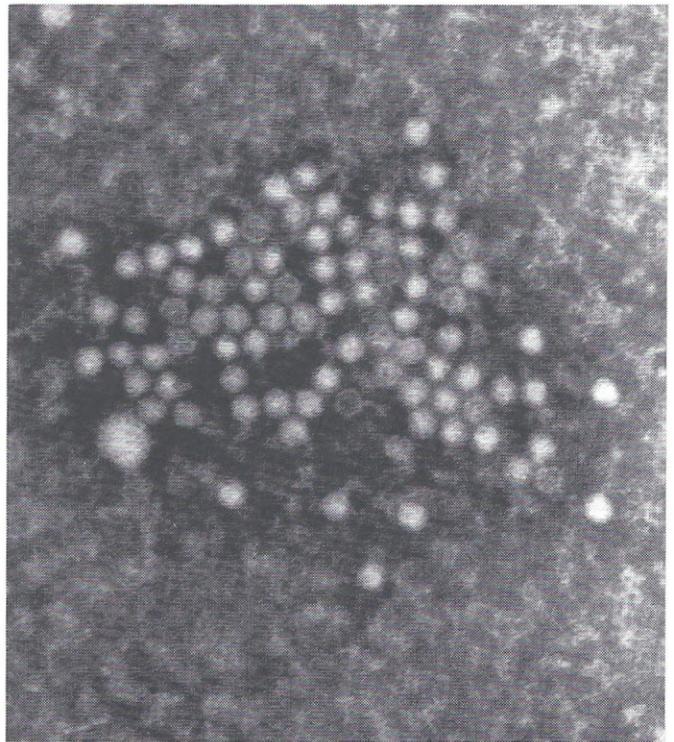


Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas virais obtidas a partir do sobrenadante de cultura de células C6/36.

portanto uma mistura de populações de células. JOUSSET et alii⁵, relatam o isolamento de um vírus persistente, não envelopado, icosaédrico, de 22nm de diâmetro, isolado de clones C6/36, denominado parvovírus de *Aedes albopictus*. IGARASHI⁴ isolou vários clones de linhagem celular de *Aedes albopictus*, identificando o clone C6/36 livre de vírus. Durante nossos estudos, no entanto, verificamos neste clone a presença de partículas virais, sem que qualquer alteração na sensibilidade das células C6/36 fosse observada no isolamento do vírus Dengue.

A hipótese de contaminação dessas células por outros arbovírus foi eliminada, uma vez que todos os testes de imunofluorescência foram negativos para alphavirus, flavivirus e bunyavirus. Células C6/36 provenientes de outras

instituições e analisadas nas mesmas condições e período mostraram resultados idênticos aos nossos, confirmando desta maneira nossos achados e afastando a possibilidade de contaminação com os arbovírus trabalhados na Seção.

Esse provável vírus endógeno pode estar presente em células C6/36 de outros laboratórios sem ser detectado. Embora nossos dados não mostrem interferência deste vírus com o isolamento do vírus dengue, o emprego dessas células para o estudo de outros vírus deve ser cuidadosamente avaliado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Seção de Culturas Celulares, do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento dos meios utilizados.

RIALA 07/835

BARBOSA, M.L.; UEDA-ITO, M & ROCCO, I.M. — PRESENCE OF AN ENDOGENOUS VIRUS IN UNINFECTED *Aedes albopictus* CELL, CLONE C6/36. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(2):29-31, 1998.

SUMMARY: Cell lines obtained from *Aedes albopictus* mosquitoes larvae has been shown to be naturally infected by viruses. The C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells obtained by Igarashi in 1978 showed to be free of viruses and has been used to isolate Dengue viruses in the majority of specialized laboratories. In our studies with these cells, we detected the presence of an endogenous virus, after different periods of incubation. Electromicroscopic analysis of the culture fluid of C6/36 cell, by negative staining, revealed the presence of a non-enveloped viral particle, from the 12th day of splitting, measuring 20nm. Analysis on days 2, 6, and 10 after the day of splitting the cells were not able to show the same type of viral particle. These cells were submitted to indirect immunofluorescence test using a panel of antisera directed to several arbovirus groups. These tests were negative, ruling out the possibility of laboratory contamination. The presence of endogenous viruses in established cell lines may occur in any laboratory without being detected. Our work showed that this endogenous virus does not influence the isolation of Dengue viruses and the cell replication. Due to the lack of data, the use of these cells to isolation of other viruses should be carefully evaluated.

DESCRIPTORS: cell line clone C6/36; endogenous virus; dengue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUBLIK, Y.; JOUSSET, J.X. & BERGOIN, M. — Structure, restriction map and infectivity of the genomic and replicative forms of AaPV DNA. Arch. Virol. 137: 229-240, 1994.
2. BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta, 34: 103-110, 1959.
3. CUNNINGHAM, A., WEBB, S.R., BUCKLEY, S.M. & CASALS, J. — Isolation of Chikungunya virus contaminating an *Aedes albopictus* cell line. J. Gen. Virol. 27: 97-100, 1975.
4. IGARASHI, A. — Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell line sensitive to dengue and chikungunya virus. J. Gen. Virol. 40: 531-544, 1978.
5. JOUSSET, F.-X.; BARREAU, C.; BOUBLIK, Y. & CORNET, M. — A parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. Virus Res. 29: 99-114, 1993.
6. HIRUMI, H., HIRUMI, K., SPEYER, G., YUNKER, C.E., THOMAS, L.A., CORY, J. & SWEET, B.H. — Viral contamination of a mosquito cell line, *Aedes albopictus* associated with syncytium formation. In vitro 12: 83-97, 1976.
7. SINGH, K.R.P. — Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.), Current Science 36: 506-5-8, 1967.
8. SINGH, K.R.P. & PAUL, S.D. — Isolation of dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. Bull. W.H.O. 4: 982-983, 1960.

Recebido para publicação em 12/01/98

SUJIDADES LEVES EM SOPAS DESIDRATADAS — ADEQUAÇÃO DE UM MÉTODO MICROSCÓPICO*

Maria Helena MARTINI**
José Paschoal BATISTUTI***

RIALA 07/836

MARTINI, M. H.; BATISTUTI, J. P. — Sujidades leves em sopas desidratadas — Adequação de um método microscópico. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 35-44, 1998.

RESUMO: Para detecção de sujidades leves em sopas desidratadas foi proposta a metodologia descrita pela AOAC 980.27 para cevada, aveia e mistura de cereais desidratados. As amostras foram contaminadas artificialmente com fragmentos de insetos: cabeças, tórax-abdomen e élitros, ácaros e pêlos de ratos brancos. Na etapa de desengorduramento e flutuação o método foi modificado quando comparou-se os efeitos de dois solventes, isopropanol 40% indicado na metodologia AOAC 980.27, etanol 60% e misturas deles nas proporções 1:1 e 3:1, respectivamente. A média de recuperação de sujidades leves, utilizando isopropanol 40% e etanol 60% (3:1) foi de: 92,6% para fragmentos de insetos, 43% para ácaros e 53% para pêlos de roedores, não diferindo significativamente ($p>0,05$), quando utilizou-se somente o isopropanol 40%; encontrando-se 93,3% para fragmentos de insetos, 39% para ácaros e 61% para pêlos de roedores. O método 980.27 modificado, utilizando isopropanol 40% e etanol 60% (3:1) foi mais eficiente para a recuperação de fragmentos de insetos. A avaliação das sujidades leves, em sopas desidratadas, no método proposto modificado empregando-se a solução de isopropanol 40% e etanol 60% (3:1), foi realizada em 62 amostras comerciais de duas marcas diferentes (A e B), produzidas no Estado de São Paulo e adquiridas em supermercados do município de Araraquara-SP. O total de amostras foi dividido em dois lotes com 31 unidades cada, constituídos por amostras do mesmo tipo, mesma marca e datas de fabricação diferentes. As amostras foram analisadas em duplicata. A maior incidência de sujidades leves ($n^{\circ}/50g$), foi para fragmentos de insetos com porcentagens de 81,8% (1 a 36 fragmentos de insetos) para a marca A e 82,5% (1 a 49 fragmentos de insetos) para a marca B. As duas marcas mostraram pequena incidência de ácaros e pêlos de roedores. Estes resultados sugerem que é necessário a revisão da legislação brasileira, quanto aos limites microscópicos, em sopas desidratadas.

DESCRITORES: microscopia; alimentos; sujidades leves; sopas desidratadas; fragmentos de insetos.

INTRODUÇÃO

O crescimento da produção brasileira de alimentos nos últimos anos e segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos, foi em 1995 4% superior à 1994, devido às mudanças no padrão de consumo, onde o consumidor, principalmente dos grandes centros urbanos, passou a adotar refeições práticas e rápidas, optando por pratos prontos ou semi prontos¹⁵.

As sopas desidratadas apresentaram em 1995, um aumento de 16% na produção em relação a 1994^{27, 31},

sendo consumidas pela população, além de fazerem parte da merenda das escolas oficiais, no Brasil.

A sopa desidratada é o produto obtido pela mistura de ingredientes como cereais, vegetais desidratados, farinha de cereais, leite em pó, condimentos, massas alimentícias, extrato de carnes entre outros, segundo Resolução nº 12/78⁷ e portanto, está sujeita à incorporação de matérias estranhas, que podem contaminar o produto desde a colheita até a distribuição do produto final.

A presença de sujidades leves em alimentos, como insetos e seus fragmentos, ácaros, pêlos de roedores,

* Da Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, 1997.

** Instituto Adolfo Lutz — Laboratório Regional de Campinas

*** Depto. de Alimentos e Nutrição — Fac. Ciênc. Farmacêuticas — UNESP- Araraquara- SP.

excrementos, entre outros, pode ser proveniente de falhas durante a colheita, transporte e manuseio das matérias-primas, durante o processo de produção, estocagem e distribuição dos alimentos¹⁸. Desse modo torna-se importante identificar essas matérias estranhas, determinadas através de métodos microscópicos, pois geralmente não são identificadas macroscopicamente.

Algumas matérias estranhas podem não ser prejudiciais à saúde, mas a sua presença em altos níveis indica que o alimento não foi manipulado adequadamente.

Poucos são os trabalhos existentes para a determinação de sujidades leves em sopas desidratadas.

Zamboni et alli.³⁶ propuseram um método para detecção de sujidades leves em sopas desidratadas, através de um preparo prévio para a separação de seus componentes em macarrão, ingredientes moídos e proteína texturizada de soja e a partir daí aplicaram os métodos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), para cada componente isoladamente. Segundo os autores o método foi adequado, porém trabalhoso e difícil de ser implantado na rotina laboratorial, conclusão também levantada por Correia & Atui¹³ que empregaram em misturas para o preparo de sopas e risoto a metodologia indicada por Gecan & Cichowicz²³, para pães e produtos gordurosos, onde não há separação dos ingredientes, e verificaram, após análises em 50 amostras de cada produto, que o método é eficiente.

Nos procedimentos da AOAC⁴ está descrita uma metodologia para produtos desidratados infantis contendo cevada, aveia e mistura de cereais, que foi avaliada em função das semelhanças entre esses produtos e as sopas desidratadas.

O presente trabalho teve como objetivos:

a) adequar um método para matérias estranhas, sujidades leves, em sopas desidratadas,

b) avaliar a incidência de contaminação por sujidades leves, em sopas desidratadas comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Amostras para adequação do método

Foi utilizado para adequar o método de avaliação de sujidades leves em sopas desidratadas, as seguintes amostras:

a) Amostras de mistura desidratada para sopa com carne, macarrão e legumes, utilizadas na merenda escolar, pela Prefeitura Municipal de Campinas (embalagens de 5kg), foram contaminadas artificialmente com 5 cabeças e 5 tórax-abdômen de *Sitophilus sp* (adultos) e 5 cabeças e 5 tórax-abdômen de *Tribolium sp* (adultos), 10

ácaros das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Cheyletus malaccensis* e 10 pêlos de *Rattus norvegicus*, branco linhagem Wistar.

b) Amostras de mistura desidratada para sopa com macarrão e legumes, adquiridas em supermercados da cidade de Araraquara-SP (embalagens de 63g), foram contaminadas artificialmente com 10 fragmentos de élitros de *Sitophilus sp*, 10 ácaros das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Cheyletus malaccensis* e 10 pêlos de *Rattus norvegicus*, branco linhagem Wistar.

A contaminação artificial das amostras seguiu a metodologia descrita por Brickey JR.¹⁰ e Freeman²⁰.

Amostras avaliadas pelo método proposto

Foram avaliadas, sessenta e duas amostras comerciais de mistura desidratada para sopa, de diferentes tipos e pesos, de duas marcas, designadas A e B, produzidas no Estado de São Paulo, durante o ano de 1993 e 1994, adquiridas em supermercados da cidade de Araraquara-SP.

O total de amostras foi dividido em dois lotes com 31 unidades cada (11 unidades da marca A e 20 unidades da marca B), constituídos por amostras do mesmo tipo, mesma marca e data de fabricação diferentes. As análises foram realizadas em duplicata, em alíquotas de 50g cada.

Para a identificação das sujidades leves utilizou-se manuais técnicos^{9,26,33}.

MÉTODOS

O método empregado na adequação e padronização da determinação das sujidades leves foi o descrito pela AOAC 980.27⁴ para determinação de sujidades leves em aveia, cevada e mistura de cereais desidratados para alimento infantil, com as seguintes modificações:

— substituição de 20mL de igeal DM-710 por 20mL de lauril sulfato de sódio,

— no desengorduramento e flutuação foram utilizadas soluções de: etanol 60%, isopropanol 40% (método oficial) e misturas de soluções de isopropanol 40% e etanol 60%, nas proporções de 1:1 e 3:1.

Os testes para adequação do método foram realizados com 5 e 10 repetições em sub-amostras de 50g, com as amostras de misturas desidratadas para sopa com carne macarrão e legumes, contaminadas artificialmente. Avaliou-se a recuperação das sujidades leves (contaminação artificial), número de papéis de filtro e a quantidade de resíduo.

Antes da contaminação artificial, as amostras foram avaliadas quanto à presença de fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedores, a fim de se verificar a quantidade de sujidades leves presentes.

Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através da análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ambos com critério de probabilidade significativa de $p < 0,05$, utilizando-se do programa estatístico STATGRAPHICS (Statistical Graphics Corporation, USA, STSC Inc., 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta de escolha do método da AOAC nº 980.27^a deveu-se ao fato de ser destinado para identificar sujidades leves em cevada, aveia e mistura de cereais desidratados para alimento infantil contendo vegetais, amido, proteínas e gordura.

As sopas desidratadas, em geral, apresentam na sua composição cereais, vegetais, proteína animal e vegetal, gordura, aromas e condimentos.

Embora as sopas desidratadas apresentem maior variedade de constituintes do que a mistura de cereais, sob o ponto de vista da análise microscópica, esse método apresenta a fase de hidrólise ácida, peneiramento, desengorduramento e flutuação para extração das sujidades leves, contemplando todos os ingredientes contidos na mistura desidratada para sopa.

Assim o pré-tratamento, se inicia com a hidrólise ácida e auxílio de calor para dissolver amido e proteína; seguido do desengorduramento, com o auxílio do copo de papel de filtro, utilizando-se o isopropanol aquecido.

A extração é realizada com o emprego do frasco armadilha de Wildman, através do processo de flutuação em óleo, utilizando a solução de isopropanol, que diminui o peso específico e a tensão superficial do meio aquoso proporcionando, assim, sedimentação mais rápida dos

tecidos vegetais, presentes em grande quantidade nesses produtos. Nesta fase, a aplicação das soluções de Tween 80 e de Na₂EDTA, surfactante e sequestrante, respectivamente, em meio de isopropanol previne a flutuação dos constituintes vegetais para a camada oleosa^{2, 28, 34}.

Quanto às modificações no método, a substituição do Igepal DM- 710 por lauril sulfato de sódio a 2% deveu-se a sua escassez no mercado nacional. Barbieri³ indica o uso do lauril sulfato de sódio em substituição ao Igepal DM- 710 para a detecção de sujidades leves em alimentos desidratados infantis.

Antes da contaminação artificial das amostras de sopas desidratadas, avaliou-se a quantidade de sujidades leves presentes e os resultados estão descritos na Tabela 1. As sujidades encontradas não interferiram na contagem após contaminação artificial, devido à padronização dos contaminantes.

TABELA 1

Avaliação de sujidades leves pelo método da AOAC980.27^a antes da contaminação artificial das amostras de sopas desidratadas.

Amostras	Frag. de insetos	Ácaros	Pêlos de roedores
sopa com carne macarrão e legumes (a)	2	0	0
sopa com macarrão e legumes (b)	45	0	0

Frag.= fragmentos

TABELA 2

Recuperação dos fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedores com utilização do isopropanol 40%.

Repetições	Cabeças	Tórax/abdomen	Frag. de élitros	Ácaros	Pêlos de roedores
1	10	10	8	7	4
2	10	10	9	3	7
3	10	10	9	4	5
4	10	9	10	5	8
5	7	8	10	6	4
6	-	-	-	4	3
7	-	-	-	5	1
8	-	-	-	1	9
9	-	-	-	2	10
10	-	-	-	2	10
M (DP)	9,4(1)	9,4(0,9)	9,2(0,8)	3,9(2)	6,1(3)

M- média DP- desvio padrão

Frag. = fragmentos

Após a contaminação das amostras de sopas desidratadas, os valores encontrados para a recuperação das sujidades leves pelo método proposto foi de 94% ± 1 para cabeças de insetos, 94% ± 0,9 para tórax-abdômen e 92% ± 0,8 para élitros, Tabela 2; valores estes superiores aos resultados obtidos por Dent¹⁶, que foi de 86%.

A recuperação de ácaros e de pêlos de roedores foi de 39% ± 2 e 61% ± 3, respectivamente, (Tabela 2). A baixa porcentagem de recuperação para os ácaros pode ser devido às alterações sofridas na sua estrutura, isto é, fragmentam-se tornando-se muitas vezes semelhantes ao resíduo que permanece no papel de filtro leitura, e, assim, a sua identificação torna-se difícil.

Na definição de sujidades leves e mesmo nos métodos recomendados pela AOAC⁵ até 1995, os ácaros não são referidos. Brickey JR.¹¹ refere-se ao método do funil de Berlese para identificação de insetos e ácaros vivos; mas em trabalhos publicados por Decanio¹⁴, Olsen³⁰ e Gecan²², os ácaros são considerados como sujidades leves.

Nas análises de rotina em microscopia de alimentos, é freqüente a presença de ácaros recuperados pelos métodos empregados para sujidades leves, como demonstram os trabalhos publicados por Zamboni et alli.^{35,36,37,38,39}, Cano¹² e Correia¹³.

O método utilizado demonstrou baixa recuperação para os pêlos de roedores, pois estes fragmentos ficaram retidos na malha do tamis, após observação ao microscópio estereoscópico, com exceção das repetições, 9 e 10, como demonstrado na Tabela 2.

Como, a princípio, a utilização de copos de papel foi considerada fator limitante na retenção dos pêlos de roedor, fez-se o controle, através de observações ao microscópio estereoscópico, verificando-se que os pêlos não ficaram retidos nesta etapa. A fim de evitar perdas de fragmentos de insetos ou outras sujidades, durante a transferência, do material, necessária entre as etapas,

fez-se lavagens sucessivas da vidraria com solução alcoólica.

Dent & Glaze¹⁷, na análise microscópica de manjeirona em flocos, obtiveram cerca de 73% de recuperação de pêlos de roedores. Glaze²⁵ trabalhando com pasta e molho de peixe sem condimentos, encontrou cerca de 76% e 77% de recuperação de pêlos de roedores. Nakashima²⁹ observou para creme de feijão desidratado, 70% e 85% de recuperação de pêlos de roedores; Glaze²⁴, em produtos de peixe com condimentos, obteve recuperações para pêlos de roedores de 71,6 % e 89,4%. Shostak³² encontrou, para produtos de chocolate, cerca 95% de recuperação; Dent¹⁶, para cevada, aveia e misturas de cereais infantis, encontrou 92% de recuperação de pêlos de roedores. Freeman¹⁹, em estudos com sálvia verificou uma recuperação de 92,1%.

Correia & Atui¹⁵ obtiveram cerca de 85% de recuperação de pêlos de roedores, quando conduziram estudos para detecção de sujidades leves em misturas para preparo de sopas e risotos.

Nos trabalhos onde os resultados para pêlos de roedores foram mais baixos, cerca de 71,6% a 76%, não existem referências específicas ou discussões sobre possíveis dificuldades para a recuperação desta sujidade leve^{24, 25}.

A pequena quantidade de resíduo que permaneceu nos papéis, não dificultaram a identificação e quantificação das sujidades, com exceção dos ácaros, como foi discutido anteriormente.

A modificação proposta ao método da AOAC 980.27⁴, utilizando o etanol ou soluções alcoólicas contendo volumes menores de isopropanol, deveu-se ao fato de alguns métodos indicados pela AOAC utilizarem o etanol 60%, que apresenta a vantagem de se trabalhar com soluções menos tóxicas, segundo Brickey Jr.¹¹, e de menor custo.

As tabelas de 3 a 5 mostram a recuperação das sujidades leves em sopas desidratadas utilizando diferentes solventes orgânicos.

TABELA 3
Recuperação de fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedores com a utilização de etanol 60%.

Repetições	Cabeças	Tórax/abdômen	Ácaros	Pêlos de roedores
1	5	3	8	6
2	8	4	8	4
3	6	4	5	5
4	7	9	7	7
5	7	7	6	5
M(DP)	6,6 (1)	5,4 (2,5)	6,8 (1,3)	5,4 (1,14)

M- média DP- desvio padrão

O desengorduramento e etapa de flutuação das amostras utilizando a solução de etanol 60% (Tabela 3), permitiram recuperações para fragmentos de insetos de 66% 1 para cabeças e 54% ± 2,5 para tórax-abdômen. Esses valores são significativamente (p<0,05) inferiores aos obtidos, com isopropanol 40% como mostra a Tabela 2.

A recuperação de pêlos de roedores, como mostra a Tabela 3, foi semelhante aos resultados obtidos com solução de isopropanol 40% (Tabela 2), não havendo diferenças significativas (p> 0,05).

A Tabela 3 mostra, também, a porcentagem de recuperação de ácaros utilizando-se solução de etanol 60%. Os resultados demonstram recuperação superior e significativamente diferente (p<0,05) quando utilizou-se iso-

propanol 40% para o desengorduramento e etapa de flutuação, (Tabela 2).

A mistura de isopropanol 40% e etanol 60%, na proporção 1:1, para o desengorduramento das amostras e na etapa de flutuação, permitiu maior recuperação de cabeças, onde os resultados (Tabela 4) não diferem significativamente (p>0,05) daqueles obtidos quando a amostra foi desengordurada com isopropanol 40% (Tabela 2). Entretanto, a Tabela 4 também mostra que a porcentagem de recuperação de tórax-abdômen foi significativamente (p<0,05) inferior àquela obtida com isopropanol 40%.

Somente 30% ± 1 de pêlos de roedores e 70% ± 1,6 de ácaros foram recuperados, quando as amostras de

TABELA 4

Recuperação de fragmentos de insetos com a utilização das soluções de isopropanol 40% e etanol 60%, (1:1).

Repetições	Cabeças	Tórax/abdômen	Ácaros	Pêlos de roedores
1	10	6	8	3
2	10	7	7	1
3	9	9	5	4
4	8	6	6	3
5	9	7	9	4
M(DP)	9,2 (0,8)	7 (1)	7 (1,6)	3 (1)

M- média DP- desvio padrão

TABELA 5

Recuperação de fragmentos de insetos, ácaros e pêlos de roedores com as soluções de isopropanol 40% e etanol 60% (3:1).

Repetições	Cabeças	Tórax/abdomen	Frag. de élitros	Ácaros	Pêlos de roedores
1	9	6	10	9	4
2	10	9	9	5	7
3	10	8	10	5	2
4	10	9	10	6	5
5	10	9	10	5	1
6	-	-	-	3	7
7	-	-	-	4	6
8	-	-	-	2	7
9	-	-	-	3	7
10	-	-	-	1	7
M (DP)	9,8(0,4)	8,2(1)	9,8(0,4)	4,3 (2)	5,3 (2)

M- média DP- desvio padrão Frag.— fragmentos

sopas desidratadas contaminadas artificialmente, foram desengorduradas com a mistura de isopropanol 40% e etanol 60%, 1:1, como mostra a Tabela 4.

Aumentando-se a proporção de isopropanol 40% na mistura com etanol 60% a 3:1, para o desengorduramento e flutuação das amostras, houve um aumento na porcentagem de recuperação de alguns fragmentos. A Tabela 5 mostra que $98\% \pm 0,4$ das cabeças, $82\% \pm 1$ de tórax-abdômen e $98\% \pm 0,4$ de élitros foram recuperados. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre esses resultados e aqueles obtidos quando as amostras foram tratadas com isopropanol 40% (Tabela 2).

As recuperações obtidas de ácaros e pêlos de roedores foram, respectivamente, $43\% \pm 2$ e $53\% \pm 2$ (Tabela 5) quando as amostras foram desengorduradas com mistura de isopropanol 40% e etanol 60% na proporção 3:1. Esses resultados não são diferentes significativamente ($p > 0,05$), dos obtidos com o desengorduramento realizado com isopropanol 40% (Tabela 2).

Os fragmentos de insetos, cabeças, tórax-abdômen e élitros, bem como ácaros e pêlos de roedores, foram recuperados com a mesma porcentagem em amostras tratadas com solução de isopropanol 40% ou com mistura composta por isopropanol 40% e etanol 60% na proporção 3:1.

A avaliação de sujidades leves em amostras comerciais de sopas desidratadas foi realizada com o método proposto, onde a etapa de desengorduramento e flutuação foi realizada com a mistura de isopropanol 40% e etanol 60%, na proporção de 3:1.

Os resultados obtidos para sujidades leves em sopas desidratadas de duas marcas comerciais, para as duas amostragens, estão descritos nas Tabelas 6.

A ausência de sujidades leves, segundo o método AOAC 980.27 modificado, neste estudo, somente foi observada em um tipo de sopa da marca A e em quatro tipos da sopa da marca B, na primeira amostragem.

As amostras de sopas desidratadas da marca A tendo na sua composição macarrão, juntamente com farinha de trigo, amido de milho e outros ingredientes, apresentaram a maior quantidade de fragmentos de insetos, confirmando observações da literatura, em que a frequência para fragmentos de insetos foi maior do que para as outras sujidades leves^{21,22}. As amostras da marca A apresentaram 90,9% de fragmentos de insetos cuja quantidade variou de 1 a 36 e 80,0% das amostras do tipo B continham até 49 fragmentos de insetos (Tabela 6).

As sopas desidratadas disponíveis comercialmente demonstraram pequena incidência de ácaros e pêlos de roedores devido a baixa porcentagem de recuperação do método para estas sujidades ou os produtos não as continham, ou ambos.

A pesquisa de sujidades leves na segunda amostragem das sopas desidratadas vem apenas confirmar os resultados obtidos com a primeira amostragem, apesar da ocorrência de algumas diferenças quantitativas (Tabela 6). Poucos tipos de produtos da marca A (27,3%) e da marca B (15%) apresentaram ausência de sujidades leves.

Observou-se que 72,7% das amostras da marca A apresentaram até 22 fragmentos de insetos e, cerca de 85,0% dos tipos de sopas da marca B apresentaram até 21 fragmentos de insetos.

A segunda amostragem revelou também baixa incidência de ácaros e pêlos de roedores.

Considerando as duas amostragens, 81,8% das amostras da marca A apresentaram até 36 fragmentos de insetos e 18,2% não apresentaram nenhum fragmento de inseto. Para as amostras da marca B, 82,5% apresentaram até 49 fragmentos de insetos e 17,5% não apresentaram nenhuma incidência da referida sujidade.

Vale salientar que ao final de todo o procedimento do método proposto pela AOAC 980.27 e modificado no presente estudo, para sopas desidratadas, obteve-se pequena quantidade de resíduo. Entretanto, esta quantidade modifica-se em virtude da presença na composição das amostras, de ingredientes cuja densidade é próxima ao dos fragmentos de insetos, caso particular da couve (*Brassica oleracea*), presente nas amostras 11 e 31 da marca B, onde ocorreu um aumento de resíduo, tornando mais demorada a identificação das sujidades leves.

A quantidade de sujidades leves observadas nas sopas desidratadas analisadas, permite-nos salientar que estes alimentos, frequentemente, consumidos pela população brasileira, são considerados insatisfatórios do ponto de vista higiênico-sanitário, tendo em vista, que a legislação brasileira⁷ condena a presença de apenas um fragmento de inseto neste tipo de alimento.

Barbieri¹ relata que é praticamente impossível, pelos dados apresentados na revisão da literatura, processar alimentos totalmente isentos de contaminação, uma vez que os procedimentos mecânicos para limpeza não conseguem retirar totalmente as sujidades⁸.

A exemplo do ocorrido com a legislação brasileira⁶, que através de recente Portaria 74/94, estabelece níveis de tolerância para farinha de trigo e derivados, ressalta-se a urgência de estudos, com relação aos demais alimentos, adequando-os não só a nossa realidade como também visando o mercado internacional.

CONCLUSÕES

O método proposto para sujidades leves em sopas desidratadas, AOAC 980.27 modificado, empregando a

TABELA 6

Sujidades leves (nº/50g) encontradas em amostras de sopas desidratadas de 2 marcas comerciais (A e B), na primeira amostragem (1º e 2º repetições) e segunda amostragem (1º e 2º repetições).

Marcas/ amostras	Fragmentos de insetos				Ácaros				Pêlos de roedor			
	primeira amostragem		segunda amostragem		primeira amostragem		segunda amostragem		primeira amostragem		segunda amostragem	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
A1	25	34	19	20	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	16	19	5	15	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	5	3	4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A4	36	15	22	15	0	0	0	1	1	0	0	0
A5	14	12	19	18	0	0	0	0	0	0	0	0
A6	9	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A7	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A8	3	6*	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
A9	33	23*	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0
A10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11	1	2	6	3	0	0	0	0	1	0	0	0
B1	29	27*	12	8	0	0	0	0	1	0	0	0
B2	11	14	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	14	7	12	14	0	1	0	0	0	0	0	0
B4	5	3*	8	4	0	0	0	0	0	1	0	0
B5	15	22	10	13	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	6	8	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
B7	8	4	9	14	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	14*	12	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	22	14	14	13	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	49	22	13	18	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	13	14	9	10	0	0	0	0	0	1	0	0
B14	7	8	12	14*	0	0	0	0	0	0	0	0
B15	32	15	14	21*	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B20	10	13	21	13	0	0	0	0	0	0	0	0

*.um inseto inteiro

solução de isopropanol 40% e etanol 60% (3:1), apresentou uma recuperação média de 92,7% para fragmentos de insetos, considerado bom resultado. No entanto, os resultados de recuperação para ácaros e pêlos de roedores de 43% e 53%, respectivamente, não foram considerados satisfatórios. Conclui-se portanto que o método é adequado apenas para fragmentos de insetos.

O tratamento realizado com a solução alcoólica de isopropanol 40% e etanol 60% na proporção de 3:1 (v/v) não diferiu estatisticamente do tratamento com a solução de isopropanol 40% preconizada pelo método da AOAC 980.27.

Através dos resultados encontrados para sujidades leves, em sopas desidratadas é necessário a revisão da legislação brasileira, quanto aos limites microscópicos.

RIALA 07/836

MARTINI, M. H.; BATISTUTI, J. P. — Light filth in dried foods — Microscopic method Evaluation. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(2):33-42, 1998

ABSTRACTS: The official methodology proposed for light filth by AOAC 980.27, from barley, oatmeal, and mixed dry infant cereals, was tested for dried soups. Soup samples were artificialy contaminated with insects fragments: heads, torax-abdomen, elytral squares, mites and rodents hairs fragments. The two solvents effects were analysed, 40% isopropanol and 60% ethanol and mixtures of them 1:1, 3:1, to deffating and flotation of dried soups samples. Average recoveries of insect fragments, mites and rodent hairs were 92,6%, 43% and 53%, respectively for the proposed method (40% isopropanol and 60% ethanol, 3:1). These results were not significantly different ($p < 0,05$) than the official method 980.27 that were found an of average recoveries of 93,3% for insect fragments, 39% for mites, and 61% for rodent hairs. The modified AOAC 980.27 method (40% isopropanol and 60% ethanol, 3:1) was more efficient for recovery of insect fragments. The light filth evaluation in commercial dried soups with the proposed method was carried out in 62 samples (of two differents brands, A and B), divided into two lots each one with 31 samples. The dried soups were produced in the State of São Paulo and bought in Araraquara (SP) supermarkets. All of the samples were analysed in duplicates. The high incidence of light filth (n0/50g) was 81,8% (1 to 36 insects fragments) for insects fragments in brand A and 82,5% (1 to 49 insects fragments) in brand B. There was a low incidence of mites and rodent hairs fragments. These results also suggest that is need a review about an acceptable level for light filth in Brazilian foods legislation.

Keywords: Microscopy; food; light filth; dried soups; insect fragments.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. BARBIERI, M. K. **Desenvolvimento de um método para determinação de matérias estranhas em bananas- passas e avaliação da contaminação de produtos comerciais.** Campinas, 1994. 110 p. [Dissertação Mestrado em Tecnologia de Alimentos — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
2. BARBIERI, M. K. **Matérias estranhas: contaminação, técnicas de isolamento e detecção em farinha de trigo.** *Colet. ITAL, (Campinas)*, v. 22, p.13- 22, 1992.
3. BARBIERI, M. K. **Microscopia em alimentos: identificação histológica, isolamento e detecção de material estranho em alimentos.** Campinas: ITAL, 1990. 109p. (Manual Técnico).
4. BOESE, J. & BANDLER, R. M. **Extraneous materials: isolation.** In: **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.** Official methods of analysis. 15.ed. Arlington, VA., 1990. v.1, p.369-406.
5. BOESE, J., CICHOWICZ & S. M. **Extraneous materials: isolation.** In: **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.** Official methods of analysis. 16.ed. Arlington, VA., 1995. v.1, p.1- 47.
6. BRASIL. Portaria nº 74, 4 ago. 1994. Estabelece o limite máximo de 75 fragmentos de insetos em 50g de farinha de trigo e 225 fragmentos em 225g para massas alimentícias, biscoitos, produtos de panificação e confeitaria. *Diário Oficial*, Brasília, p.11809.
7. BRASIL. Resolução Normativa nº 12/78. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo,

- relativa a alimentos e bebidas. **Diário Oficial**, Brasília 24 de jul. 1978, Seção I, pt. I, p.11525.
8. BRICKEY JR., P. M. Concepts of food protection — food sanitation and FD&C Act. In: GORHAM, J.R. **Principles of food analysis for filth, decomposition and foreign matter**. 2. ed. Washington, DC: FDA, 1981, p.3- 10.
9. BRICKEY JR., P. M. Identification of insects fragments. In: GORHAM, J.R. **Training manual for analytical entomology in food industry**. Washington, DC, FDA, 1978, p. 53- 60 (FDA Technical Bulletin, 2).
10. BRICKEY JR, P.M., GECAN, J.S., THRASHER J.J.& EISENBERG, W. V. Notes on microanalytical techniques in the analysis of foods for extraneous materials. **J. Assoc.Off. Anal. Chem.**, v.51, p.872-6, 1968.
11. BRICKEY JR, P.M., GECAN, J.S., THRASHER J.J.& VAZQUEZ, A.W. Notes on microanalytical techniques in the analysis of foods for extraneous materials. **J. Assoc.Off. Anal. Chem.** Washington, v.55, p.51- 6, 1972.
12. CANO, C. B., ZAMBONI, C. Q., ALVES, H. I., SPITERI, N., ATUI, M. B., SANTOS, M. C., JORGE, L. I. F., PEREIRA, U. & RODRIGUES, R. M.M. Mel: fraudes e condições sanitárias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.52, p.1- 4, 1992.
13. CORREIA, M. & ATUI, M. B. Metodologia de análise microscópica para avaliação das condições higiênicas em misturas para o preparo de sopas e risotos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.55, p.73- 7, 1995.
14. DECANIO, M. G. Infestação de produtos alimentícios nas fontes de produção e durante o armazenamento. Um método para a pesquisa microscópica de sujidades e impurezas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.3, p.131- 7, 1971.
15. DE CESARE. Crescimento em ritmo de fast-food. **Superhiper**, São Paulo, p. 156, 158, out. 1995.
16. DENT, R.G. Extraction of light filth from barley, oatmeal, and mixed dry infant cereals: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.63, p.187- 8, 1980.
17. DENT, R.G. & GLAZE, L. Extraction of light filth from unground marjoram: collaborative study. **J. Assoc.Off. Anal. Chem.**, v.68, p.899-901, 1985.
18. EISENBERG, W. V. Source of food contaminants. In: GORHAM, J.R. **Principles of food analysis for filth, decomposition and foreign matter**. 2. ed. Washington, DC: FDA, 1981. p.11- 26. (FDA Technical Bulletin, 1).
19. FREEMAN, C.C. Brine saturation technique for extraction of light filth from rubbed, ground, and whole sage: collaborative study. **J. Assoc.Off. Anal. Chem.**, v.68, p.894- 8, 1985.
20. FREEMAN, C.C. Technique for preparing spike elements for study samples of extraneous materials. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.65, p.277, 1982.
21. GECAN, J.S. & ATKINSON, J. Microanalytical quality of macaroni and noodles. **J. of Food Prot.**, v.48, p. 400-2, 1985.
22. GECAN, J.S. & ATKINSON, J. Microanalytical quality of wheat flour. **J. of Food Prot.**, v. 46, p.582-4, 1983.
23. GECAN, J. S. & CICHOWICZ, S. M. Extraneous materials: isolation. In: **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**. Official methods of analysis. 14. ed. Arlington, VA., 1984. p.902.
24. GLAZE, L.E. Extraction of light filth from oriental fish products containin spice: collaborative study. **J. Assoc.Off. Anal. Chem.**, v.76, p.44- 6, 1993.
25. GLAZE, L.E. Extraction of light filth paste and sauce (Bagoong) not containig spice: collaborative study. **J. Assoc.Off. Anal. Chem.**, v.75, p. 263- 5, 1992.
26. GORHAM, J. R. Filth in foods implications for health. In: ———. **Principles of food analysis for filth, decomposition and foreign matter**. 2. ed. Washington, DC: FDA, 1981. p.27-31. (FDA Technical Bulletin, 1).
27. MAIS alimentos — **Gazeta mercantil**, São Paulo, 07 fev 1996a, caderno Opinião p. A- 3.
28. NICHOLSON, J.F., HARRIS, K.L.& YAKOWITZ, M.G. Principles of isolation and detection of food and drug contaminants. In: HARRIS, K.L.& REYNOLDS, H.L.(Ed.) **Microscopic analytical methods in food and drug control**. Washington, DC: FDA, 1960. p. 29- 52 (FDA Technical Bulletin, 1).
29. NAKASHIMA, M. J. Extraction of light filth from dried bean curd: collaborative study, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.75, p.266-8, 1992.
30. OLSEN, A.R. Mites and other filth in dried shrimp imported into the United States from the Orient. **J. of Food Prot.**, v.45, p.1204- 7, 1982.
31. REAL muda hábitos de consumo. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 07 fev. 1996b, caderno Agribusiness, p B-16.
32. SHOSTAK, M.T. Improved method for determination of light filth in chocolate products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.61, p.996- 8, 1978.
33. VAZQUEZ, A.W. Recognition of insect fragments. In: GORHAM, J.R. **Training manual for analytical entomology in the food industry**. Washington, DC: FDA, 1978. p.- 52,61-75. (FDA Technical Bulletin 2).
34. ZAMBONI, C. Q. **Curso de Bromatologia para Técnicos do Ministério da Saúde**. Aulas teóricas

- de microscopia alimentar. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1977. 105 p. (mimeog.).
35. 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*, v. 49, p.11- 7, 1989.
36. ZAMBONI, C. Q., ALVES, H. I. & ATUI, M. B. Métodos para detecção de sujidades leves em sopas desidratadas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.50, p.301- 5, 1990.
37. ZAMBONI, C. Q., ALVES, H. I., RODRIGUES, R. M. M. S., SPITERI, N., ATUI, M. B. & SANTOS, M. C. Fraudes e sujidades em condimentos comercializados na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.51, p.19- 22, 1991.
38. ZAMBONI, C. Q., RODRIGUES, R. M. M. S., SPITERI, N., ALVES, H. I., BATISTIC, M. A., ATUI, M. B. & SANTOS, M. C. Fraudes e condições de higiene de doces em pasta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.49, p.125-9, 1989.
39. ZAMBONI, C. Q., ALVES, H. I., RODRIGUES, R. M. M. S., SPITERI, N., ATUI, M. B. & BATISTIC, M. A. Sujidades e fraudes em chocolates. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.48, p.37- 41, 1988.

Recebido para publicação em 15/01/98

**SALMONELLA: SOROTIPOS IDENTIFICADOS DAS CEPAS ISOLADAS DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS E NÃO HOSPITALIZADOS, NA REGIÃO
DE PRESIDENTE PRUDENTE, SP, NO PERÍODO DE 1978-1997.**

Maria Regina N.R. ESPER*
Aracelis Moreno de FREITAS*
Sueli Aparecida FERNANDES **
Suzel N. NEME ***
Ana Terezinha TAVECHIO **
Mariza M. ROMÃO *
Marlene L. CAFÉ *

RIALA 07/837

ESPER, M.R.N., FREITAS, A. M. de, FERNANDES, S. A., NEME, S. N., TAVECCHIO, A. T., ROMÃO, M. M. e CAFÉ, M. L. — *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1977. Rev. Inst. Adolfo Lutz 57 (2): 45-50, 1998.

RESUMO: No período de 1978-1997, foram identificadas 413 cepas de *Salmonella*, isoladas de coproculturas de origem ambulatorial e hospitalar, no Setor de Microbiologia do Laboratório I Regional de Presidente Prudente. Determinou-se a sensibilidade aos agentes antimicrobianos de 394 cepas de *Salmonella*. Entre as cepas isoladas de coproculturas de origem ambulatorial observou-se grande diversidade de sorotipos (27 sorotipos) com predominância de *S. Enteritidis* (24,4 %), *S. Infantis* (19,3%) e *S. Agona* (10,1%). Em relação às cepas isoladas de pacientes hospitalizados, foram identificados 8 diferentes sorotipos, sendo que a *S. Typhimurium* representou o sorotipo prevalente (95,6%), seguido de *S. Typhi* (1%) e *S. I 4,12:i:-* (1%) .

Com relação à sensibilidade aos agentes antimicrobianos, as cepas de origem hospitalar apresentaram multirresistência, enquanto que aquelas de origem ambulatorial foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos utilizados.

UNITERMOS : *Salmonella*, Sorotipos, Resistência a antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

A salmonelose constitui um sério problema de Saúde Pública, sendo considerada como uma das mais importantes zoonoses, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. As salmonelas estão amplamente disseminadas na natureza e são responsáveis por infecções entéricas e sistêmicas. A aplicação de metodologia adequada para o isolamento de *Salmonella* nos Laboratórios de Saúde Pública tem permitido a determinação deste agente etiológico responsável por diarreias persistentes, Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA), infecções hospitalares, meningites, septicemias e

outras infecções. A identificação dos milhares de sorotipos de *Salmonella* conhecidos¹⁷ tem demonstrado ao longo dos anos a prevalência de vários sorotipos em determinada área geográfica.

Em coproculturas oriundas de pacientes ambulatoriais com infecções intestinais a contaminação é bem mais diversificada e ampla, envolvendo vários fatores externos, sendo um dos principais, a contaminação dos alimentos por *Salmonella*, causando surtos de ETA.

Considerando a importância das salmonelas em infecções humanas, este trabalho teve como objetivo determinar os sorotipos predominantes na região de Presidente Prudente, bem como verificar a sensibilidade a agentes antimicrobianos.

* Laboratório I Regional de Presidente Prudente, SP- DIR-XVI

** Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de São Paulo, SP

*** Instituto Adolfo Lutz, Lab. I Regional Ribeirão Preto, SP

MATERIAL E MÉTODOS

No período compreendido entre 1978 e 1997, foram realizadas no Setor de Microbiologia do Laboratório I Regional — DIR-XVI, de Presidente Prudente, SP, 6644 coproculturas de pacientes com enteropatias, sendo 3933 de pacientes internados em pediatria de hospital geral em sua maioria e 2711 atendidas em Centros de Saúde do município de Presidente Prudente.

O isolamento de *Salmonella* foi realizado segundo a metodologia descrita por Pessoa et alli.¹⁴ As cepas de *Salmonella* foram enviadas para a Seção de Bacteriologia do Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, para identificação bioquímica e sorológica, segundo a metodologia recomendada por Popoff e Le Minor¹⁷.

Para a determinação da sensibilidade aos agentes antimicrobianos de 394 cepas de *Salmonella* foi utilizado o método de difusão em agar descrito por Bauer et alli².

Os discos, impregnados com os antimicrobianos e as respectivas concentrações foram: Ampicilina (AM) 10 µg; Amicacina (AN) 10µg; Cloranfenicol (CO) 30µg; Colistina (CL) 10µg; Gentamicina (GN) 10µg; Kanamicina (KN) 30µg e Tetraciclina (TT) 30µg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora existam no Brasil muitos trabalhos publicados sobre a frequência de enterobactérias patogênicas, tais dados são na maioria provenientes de Capitais^{4,10,12,20} ou alguns de cidades do interior do Estado de São Paulo^{6,7,9,11,13,15}.

No presente estudo, em 6.644 coproculturas realizadas, foram isoladas 413 cepas de *Salmonella*, sendo 294 de pacientes internados em hospital geral em Presidente Prudente e 119 de pacientes ambulatoriais.

Na Tabela I estão apresentados os sorotipos das 413 cepas de *Salmonella* identificadas bem como suas porcentagens de isolamento.

A sorotipagem das cepas de *Salmonella* de origem hospitalar mostrou a presença de *S. Typhimurium* em 75,2% e 20,4% de *S. Typhimurium* lisina descarboxilase negativa (LDC neg.) perfazendo 95,6%. Este dado indica a disseminação mais restrita deste sorotipo em ambiente hospitalar. A partir de outubro de 1977, em Presidente Prudente, foram isoladas as primeiras cepas de *S. Typhimurium* LDC neg. nas fezes de crianças internadas em pediatria. Tal ocorrência deve ser ressaltada, uma vez que este fato ocorreu somente até Fevereiro de 1979. O mesmo foi isolado do meio ambiente naquela ocasião. A pequena duração desse surto pode ser devida à alteração fenotípica por mutação genética dessas cepas

em ambiente hospitalar, fato este, relatado em outro trabalho por alguns de nossa equipe⁶. Em uma criança de 3 meses internada na pediatria evidenciou-se infecção dupla por *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* LDC neg.. Deve-se ressaltar que os demais sete sorotipos isolados de pacientes hospitalizados apareceram em porcentagens muito pequenas, como é o caso de *S. Typhi* (1%), *S. I 4,12: i: —* (1%), *S. Agona* (0,7%) e *S. Oranienburg* (0,7%).

A sorotipagem das cepas de *Salmonella* de origem ambulatorial, demonstrou grande diversidade (vinte e sete sorotipos) com porcentagens de 24,4% para *S. Enteritidis*; 19,3% para *S. Infantis*; 10,1% para *S. Agona* e 6,7% para *S. I 4,5,12: i: —* e porcentagens menores para os demais sorotipos.

A maior incidência de *Salmonella* em coproculturas de origem hospitalar (98,4%) ocorreu em crianças menores de 5 anos. O grupo de 0 a 6 meses colaborou com a maioria destes casos, sendo estes dados coincidentes com os de PESSOA et alli.¹⁶ Nas coproculturas de origem ambulatorial verificou-se um índice de 45,1% em crianças menores de 5 anos, sendo somente de 15,2% no grupo de 0 a 6 meses.

No período de 1978 a 1982 foram isoladas 6 cepas de salmonelas em líquido cefalorraquidiano (LCR): três cepas de *S. Typhimurium*, uma cepa de *S. Saintpaul*, outra *S. I 4,5,12:e,h:-*, e uma não-sorotipada e em 1989 foi isolada uma cepa identificada como *S. I 1,4,5,12:i:-*. Todas as cepas procediam de crianças menores de 1 ano e internadas no hospital geral.

CALZADA et alli.³ observaram no período de 1977 a 1982, a predominância em coproculturas de *S. Typhimurium* (66,88%), sendo 22,46% de *S. Typhimurium* LDC neg., seguida de *S. Agona* (16,11%) e *S. Typhi* (3,03%).

A Figura 1, ilustra a variação anual dos sorotipos prevalentes sendo que *S. Typhimurium* aparece com o maior pico no início do período analisado principalmente nos anos de 1978, 1980 e 1982, correspondendo a surtos de infecção hospitalar, diminuindo a partir de 1983 quando houve diminuição do número de coproculturas de origem hospitalar recebidas pelo laboratório.

Em nossa região, nos pacientes de origem ambulatorial, *S. Agona* foi predominante de 1978 a 1994, portanto, durante dezesseis anos. Este quadro só foi mudado em 1994 com um aumento brusco de *S. Infantis*, consequência de dois surtos de ETA, sendo um veiculado por lanches consumidos em nossa cidade e outro de alimentos consumidos em uma penitenciária da região, sendo que alguns pacientes necessitaram de atendimento hospitalar devido a gravidade dos casos.

O aumento do isolamento de *S. Agona* em São Paulo, em 1974, foi relatado por CALZADA et alli.³ Nos Estados

TABELA 1
Distribuição dos sorotipos de *Salmonella* isolados de coproculturas
segundo a origem, no período de 1978-1997, no Laboratório I Regional de Presidente Prudente, DIR-XVI.

ORIGEM CEPAS	HOSPITALAR		AMBULATORIAL		TOTAL	
	Nº.cepas	%	Nº.cepas	%	Nº.cepas	%
S. Typhimurium	221	75,2	5	4,2	226	54,7
S. Typhimurium LDCNeg.*	60	20,4	-	0	60	14,5
S. Enteritidis	-	0	29	24,4	29	7,0
S. Infantis	-	0	23	19,3	23	5,6
S. Agona	2	0,7	12	10,1	14	3,4
S. I 4,5,12: i : -	-	0	8	6,7	8	1,9
S. Oranienburg	2	0,7	5	4,2	7	1,7
S. Ohio	-	0	6	5,0	6	1,5
S. Mbandaka	1	0,3	4	3,4	5	1,2
S. I 4,12: i : —	3	1	1	0,8	4	1,0
S. Glostrup	1	0,3	3	2,5	4	1,0
S. Typhi	3	1	-	0	3	0,7
S. Hadar	-	0	3	2,5	3	0,7
S. Give	-	0	2	1,7	2	0,5
S. Miami	-	0	2	1,7	2	0,5
S. Muenchen	-	0	2	1,7	2	0,5
S. I 6,7: r : -	-	0	2	1,7	2	0,5
S. Abacteruba	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Adelaide	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Berta	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Heidelberg	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Javiana	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Minnesota	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Newport	1	0,3	-	0	1	0,2
S. Panama	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Poona	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Schwarzengrund	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Tennessee	-	0	1	0,8	1	0,2
S. Thompson	-	0	1	0,8	1	0,2
S. I 6,8: e, h : — Lac+ **	-	0	1	0,8	1	0,2
TOTAL	294	100,0	119	99,5	413	99,5

* LDC Neg. : Lisina Descarboxilase negativa

** LAC + : Lactose positiva

TABELA 2
Porcentagem de resistência aos antimicrobianos de cepas de *Salmonella*
Typhimurium, S. Infantis, S. Enteritidis e S. Agona isoladas de coproculturas
no Lab. I Regional DIR -XVI de Presidente Prudente no período de 1978-1997, segundo a origem.

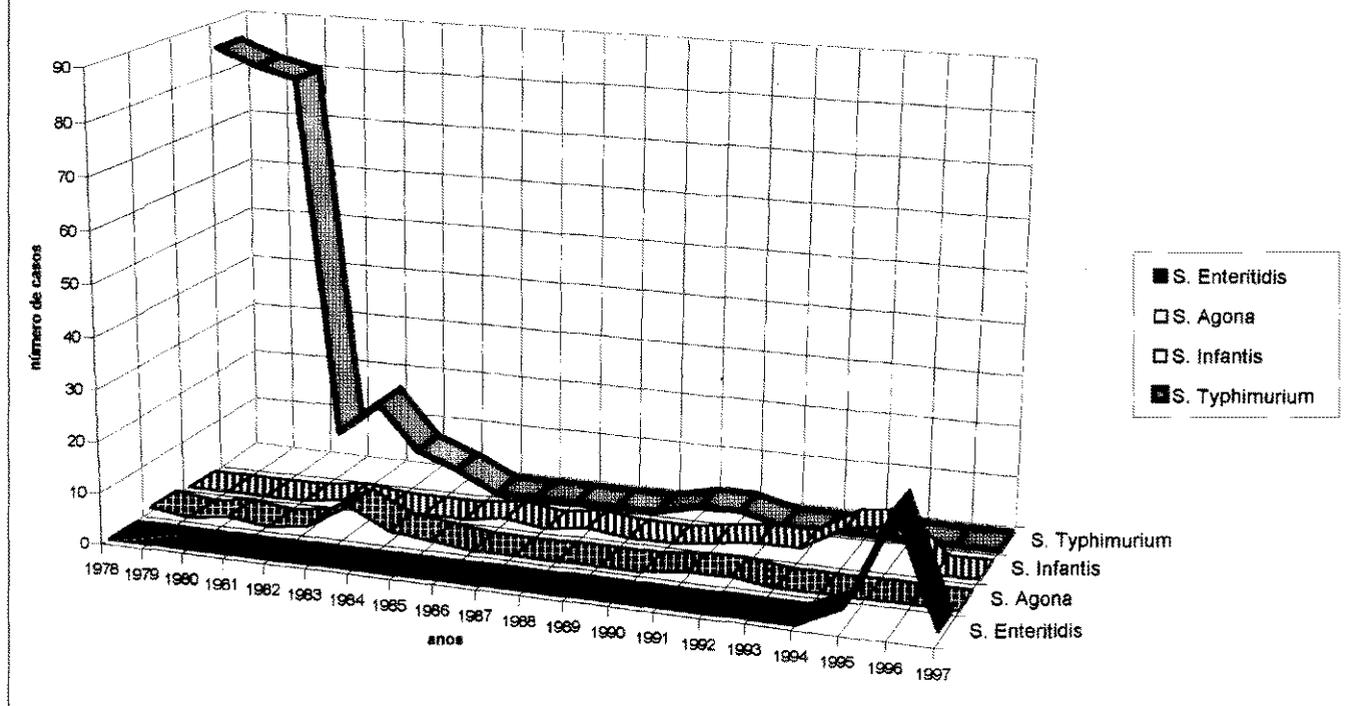
Antimicrobianos	S. Typhimurium N= 279		S. Infantis N= 23		S. Enteritidis N= 19		S. Agona N= 14	
	Origem Hosp. N= 274	Origem Amb. N= 5	Origem Hosp. N= 0	Origem Amb. N= 23	Origem Hosp. N= 0	Origem Amb. N= 19	Origem Hosp. N=2	Origem Amb. N= 12
Ampicilina	98,6	0	-	4,34	-	0	100,0	58,3
Amicacina	52,4	0	-	0	-	0	0	0
Cloranfenicol	97,9	20,0	-	0	-	0	50,0	0
Colistina	0	0	-	0	-	0	0	0
Gentamicina	81,6	20,0	-	0	-	0	0	50,0
Kanamicina	98,3	20,0	-	4,34	-	0	50,0	16,7
Tetraciclina	96,9	60,0	-	34,8	-	3,5	50,0	16,7

- = Nenhuma cepa isolada.

N = Número de cepas estudadas

FIGURA 1

Sorotipos prevalentes de cepas de *Salmonella* isoladas de coproculturas, no Lab. Regional de Presidente Prudente, no período de 1978-1997.



Unidos houve um aumento de infecção por *S. Agona* entre 1971 e 1972, fato este relatado por CLARK et alli.⁵

A evidência de *S. Enteritidis* em coproculturas em nossa região aconteceu somente a partir de 1995 (4 cepas em 1995, 23 cepas em 1996 e 2 em 1997) sendo que a maioria dos casos de infecções foi veiculada por alimentos, com relatos de que 8 pessoas necessitaram de internação hospitalar devido a gravidade dos sintomas, mas estes casos foram considerados como de atendimento ambulatorial devido a sua origem conhecida (ETA). Segundo Tavechio et alli²⁰ já ocorrera um aumento deste sorotipo em coproculturas nos dados analisados pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo a partir de 1993.

Na Tabela 2, temos a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos sorotipos de *Salmonella* de maior incidência neste estudo, isoladas de coproculturas, com as suas respectivas porcentagens de resistência, conforme a origem das mesmas. Estes dados são semelhantes aos relatados por outros pesquisadores para *S. Typhimurium* e *S. Agona*^{1,8,16,18,20}. As cepas *S. Typhimurium* e *S. Agona* isoladas de coproculturas de pacientes internados apresentaram multirresistência quando compara-

das às cepas isoladas de coproculturas de origem ambulatorial.

As três cepas de *S. Typhimurium* isoladas de LCR apresentaram-se sensíveis apenas à colistina. Quanto aos demais sorotipos isolados de LCR, *S. Saintpaul* apresentou resistência somente à amicacina e à tetraciclina e *S. I 4,5,12:e,h:-* apresentou resistência à ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina e tetraciclina.

Esses resultados demonstram que os sorotipos de *Salmonella* isolados de casos de meningites apresentaram multirresistência, tal como aqueles isolados de casos de gastriterites de pacientes hospitalizados.

Em relação as cepas de *S. Enteritidis* observou-se sensibilidade a todos os agentes antimicrobianos testados. Deve-se ressaltar que as todas as cepas testadas foram sensíveis à colistina.

Os dados laboratoriais obtidos neste estudo permitiram o traçado de um perfil dos diferentes sorotipos de *Salmonella* isolados no período estudado, bem como a incidência de salmonelose ao longo de vinte anos na região de abrangência de Presidente Prudente.

Salmonella: Sorotypes Identified of Strains Isolated from Hospitalized and non-hospitalized patients, in Presidente Prudente Area. SP, During the period of 1978-1997.

ABSTRACT: In the period of 1978-1997, 413 *Salmonella* strains isolated from stool cultures of ambulatory and nosocomial origin were identified in the Microbiology Department of the Regional Laboratory I — DIR-XVI of Presidente Prudente, SP. It was determined the antimicrobial susceptibility of 394 *Salmonella* strains.

Among strains isolated from ambulatorial patients, it was observed a great diversity of serotypes (27 serotypes) with predominancy of *S. Enteritidis* (24,4%), *S. Infantis* (19,3%) and *S. Agona* (10,1%). In respect to the strains isolated from hospitalized patients, it was identified 8 different serotypes and *S. Typhimurium* represented the prevalent serotype (95,6%), followed by *S. Typhi* (1%) and *S. I 4,12: i* : — (1%).

Concerning to the susceptibility pattern to the antimicrobial agents, the hospitalized patient strains showed multiple resistance, whereas those from non-hospitalized patients were susceptible to the majority of the drugs tested.

KEY WORDS : *Salmonella* serotypes, antimicrobial resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASENSI, M.D. & HOFER, E. — Serovars and multiple drug resistant *Salmonella* sp, isolated from children in Rio de Janeiro — Brazil. *Rev.Microbiol.*, São Paulo, **25**(3):149-53, 1994.
2. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibillity testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**:493-6, 1966.
3. CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; FERNANDES, S.A.; VAZ, T.M. & PESSOA, G.V.A. — Sorotipos de *Salmonella* identificados no período 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, **44**(1):1-18, 1984.
4. CAUDURO, P.F.; MEZZARI, A. & DIAS, C.A.G. — COPROCULTURAS: espécies patogênicas prevalentes em laboratório privado de Porto Alegre, RS. *Rev.Bras.Pat. Clin.*, **23**(6):152-6, 1987.
5. CLARK, G.M.; KAKUFMANN, A.F. & GANGAROSA, E.J. Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*. *The Lancet*, September, **1**:490-3, 1973.
6. ESPER, M.R.N.; PESSOA, G.V.A.; SPIR, M.; CALZADA, C.T.; AMATO, R.N. & FREITAS, A.M. — Infecção intra-hospitalar ocasionada por biossorotipo de *Salmonella typhimurium* lisina descaboxilase negativa em Presidente Prudente, Estado de São Paulo. *Rev.Inst.Adolfo Lutz.*, **40**(2):77-82, 1980.
7. FALCÃO, D.P. — Estudo bacteriológico de infecções entéricas em crianças de até 2 anos, no município de Araraquara, S.P. *Rev.Microbiol.*, **3**(3):127-38, 1972.
8. FERNANDES, L.C. & GALLES, M.C.T. Diarréia infantil por *Salmonella agona*. Resistência bacteriana e tratamento. *Arq.Bras.de Med.*, **63** (1):33-6, 1989.
9. GONÇALVES, A.A.G. — Estudo de uma epidemia por *Salmonella typhimurium* em hospital de Pediatria de Santos. *Rev.Bras.de Patologia Clínica*, **14**(5):251-8, 1978.
10. HOFER, E. Considerações sobre a freqüência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.*, **72**(1/2):63-72, 1974.
11. KAKU, M.; ITO, Y.Y.; BARACHINI, O.; PESSOA, G.V.A. & CARLONI, J. — Sorotipos de *Salmonella* isolados em Ribeirão Preto, S.P. durante o quinquênio de 1972-1976. *Rev. Inst.Adolfo Lutz*, **38**(1):51-7, 1978.
12. LEAL, C. & SA, A.T. — Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife — Pernambuco durante o triênio 1978-1980. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **82**(1):43-9, 1987.
13. MONTELLI, A.C. & TRABULSI, L.R. Diarréias causadas por “*Shigella*”, “*Salmonella*” e “*E. coli* enteropatogênicas” no Município de Botucatu, São Paulo. *Rev.Assoc.Med.Brasil.*, **16**(1):23-6, 1970.
14. PESSOA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T.; MELLES, C.E.A. & KANO, E. Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. I — Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, **38**(2):87-105, 1978.
15. PESSOA, G.V.A.; IRINO, K.; KANO, E. & SIMONSEN, V — Enteropatógenos em Santos: inquérito bacteriológico na população diarréica com

- mais de cinco anos de idade. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, **41**(1):71-4, 1981.
16. PESSOA, G.V.A.; IRINO, K.; MELLES, C.E.A.; CALZADA, C.T.; RASKIN, M.; KANO, E. — Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970- 1976. II — O surto epidêmico de *Salmonella typhimurium* em São Paulo. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, **38**(2):107-27, 1978.
17. POPOFF, M.Y. & LE MINOR, L. — Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella* . Paris, Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella*, 1992, p. 145.
18. RYDER, B.W.; BLAKE, P.A.; MURLIN, A.C.; CARTER, G.P.; POLLARD, R.A.; MERSON, M.H.; ALLEN, S.D. & BRENNER, D.J. Increase in antibiotic resistance among isolates of *Salmonella* in the United States. *J.Infect.Dis.*, **142**(4):485-91, 1980.
19. TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. & IRINO, K. — The role of Public Health Laboratoy in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Rev.Inst.Med.Trop., S.Paulo*, **38**(2):119-27, 1996.
20. TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. & IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev.Inst. Med.Trop., S. Paulo*, **38**(5):315-22, 1996.

Recebido para publicação em 17/01/98

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SANGUE E PLASMA BOVINO VISANDO SUA UTILIZAÇÃO EM INSUMOS ALIMENTÍCIOS*

Alessandra E. V. G. da SILVEIRA **
Alex Augusto GONÇALVES **
Cláudio da Rocha BITTENCOURT**
Gilberto Alexandre Soares GOULART **
Angélica M. SALCEDO **

RIALA 07/838

SILVEIRA, A. E. V. G. da; GONÇALVES, A. A.; BITTENCOURT, C. da R.; GOULART, G. A. S.; SALCEDO, A. M. - Caracterização microbiológica de sangue e plasma bovino visando sua utilização em insumos alimentícios. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 51-55, 1998.

RESUMO: Amostras de sangue e de plasma bovino foram avaliadas microbiologicamente, visando o uso destas fontes protéicas em alimentação humana. Foram realizadas análises de contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e fecais e pesquisa de *Salmonella* sp. Os baixos níveis de contaminação permitem dizer que, nas condições do presente trabalho, o sangue bovino bem como o plasma, obtido por centrifugação deste, apresentaram condições de uso em alimentação.

DESCRITORES: sangue bovino, plasma bovino, avaliação microbiológica.

INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul é um estado com grande atividade pecuária, onde a maioria dos subprodutos resultantes não são utilizados para fins de alimentação humana, por tabus alimentares ou pela perecibilidade química e biológica. Estes subprodutos animais como gordura, ossos, sangue, órgãos, peles, pêlos e intestinos podem ser utilizados para produção de margarinas, doces, farinhas de osso, gelatinas, farinhas de sangue e ainda para fins não alimentícios como produção de botões, produtos curtidos, cerâmicas, pincéis, cordas de instrumentos musicais, produtos farmacêuticos e usos medicinais⁹. Dentre estes subprodutos destaca-se o sangue bovino que na maioria dos pequenos frigoríficos é considerado um resíduo sem valor comercial sendo simplesmente despejado em rios, riachos e arroios, contribuindo para o aumento da carga orgânica dessas águas; ou, quando muito, é utilizado para a produção de farinha para ração animal¹².

A economia das indústrias cárnicas exige o aproveitamento dos subprodutos para poder competir com outras fontes protéicas de origem vegetal. Se estes subprodutos não forem utilizados, além de se perder um valioso potencial alimentar, elevam-se consideravelmente os custos adicionais na eliminação dos resíduos para evitar a poluição ambiental⁴.

O sangue animal pode ser aproveitado em produtos alimentícios na forma de suplemento protéico, como proteína cárnea texturizada, para clarificar alimentos (vinho), como estabilizante (queijos), como um agente emulsificante (manteiga) e como corante cárneo (produtos à base de frango). A albumina do sangue é utilizada como substituto da albumina do ovo em alimentos e se emprega na elaboração de embutidos e na fabricação de pão⁹.

A disponibilidade de sangue bovino nos abatedouros é enorme, uma vez que o volume que pode ser coletado é equivalente a 50% do sangue total do animal que, neste caso, corresponde a aproximadamente 10 — 12 litros por animal¹⁰. Usando esta relação estima-se que em 1997

* Realizado no Laboratório de Bioquímica Tecnológica - Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande - RS

** Engenheiro de Alimentos.

foram obtidos 312 milhões de litros de sangue bovino, decorrentes do abate de 26 milhões de cabeças de gado¹¹. Em termos protéicos correspondem a, aproximadamente, 54000 toneladas de proteínas desperdiçadas se considerarmos que 17,3 % das proteínas estão no sangue total.

Devido a grande disponibilidade de material, a otimização do uso desta fonte protéica é promissora. No Brasil, apesar de há muito tempo ser previsto por legislação a utilização de sangue e plasma bovino em produtos comestíveis, não existe um padrão microbiológico específico, conseqüentemente há um risco do uso descontrolado podendo acarretar na elaboração de produtos de má qualidade que podem ocasionar problemas de saúde para os consumidores. Portanto um rígido controle destes subprodutos é necessário, sendo recomendável um estudo para normatização com criação de limites máximos da carga microbiana. Para considerarmos então a utilização destes subprodutos, primeiramente é interessante fazer uma avaliação sob o ponto de vista da contaminação microbiológica, já que esta figura entre as justificativas para o emprego limitado do material³.

A intenção de desenvolver produtos elaborados (massas alimentícias, sobremesas, biscoitos, sopas, maioneses)^{5,13,14,15} tendo estes resíduos como insumos conduziu ao estudo das condições do sistema aberto de coleta de sangue, por ser mais econômico, e de obtenção do plasma bovino, de sabor e odor menos característico, visto que este aspecto tem caráter decisório na consideração destes resíduos como ingredientes alimentícios^{2,3,6,9 e 16}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de sangue e plasma bovino quando são empregados sistema de coleta aberto e centrífuga de copos para obtenção dos mesmos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras utilizadas no presente estudo foram sangue e plasma bovino. O sangue foi coletado, por sistema aberto, em um pequeno abatedouro escolhido pela sua proximidade à cidade de Rio Grande e pelo fato de desprezar este subproduto. O plasma bovino foi obtido por centrifugação do sangue (centrífuga de copos).

Foram consideradas neste trabalho diversas coletas realizadas aleatoriamente nos anos de 1994 à 1996, totalizando 4 coletas das quais retiraram-se, em duplicatas, amostras homogêneas de sangue coletado para avaliação microbiológica. Do plasma obtido, por centrifugação, foram retiradas amostras representativas para análise.

O sistema de coleta aberto empregado consistiu no uso de material previamente lavado com água fervente e desinfetado com álcool 70% (faca para sangria, balde e recipientes adequados para coleta). Após o corte da jugu-

lar, o sangue de jorro foi coletado diretamente para um recipiente contendo citrato de sódio (40%) como anti-coagulante e repassado para vasilhas menores, previamente lavadas com solução salina, para prevenção de hemólise. Estas vasilhas foram colocadas sob refrigeração e levadas ao laboratório.

Uma amostra foi retirada e submetida a análise microbiológica que consistiu em contagem total de bactérias mesófilas aeróbias; determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais e Pesquisa de *Salmonella sp.*^{7 e 8}.

O restante foi conservado quimicamente com adição de amônia a 5% para evitar deterioração e parte submetido a centrifugação (5300 G).

Numa alíquota de plasma foram realizadas as mesmas análises microbiológicas a que foi submetido o sangue bovino. O restante foi submetido a congelamento, para prolongar a vida útil do produto, até o momento de sua utilização em insumos humanos.

As operações efetuadas estão sumarizadas na figura 1.

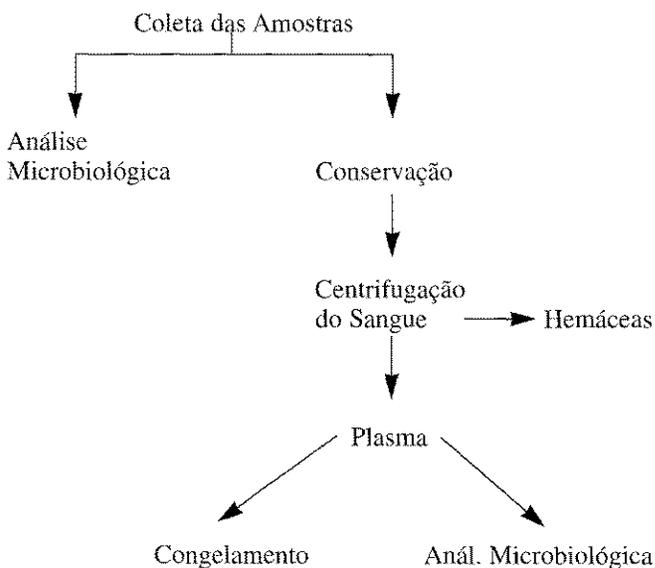


Figura 1 — Fluxograma Operacional

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através de média e intervalo de confiança (95%) com auxílio do software “Statistica for Windows” (versão 4.3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sangue bovino

Os resultados obtidos nas determinações microbiológicas do sangue bovino encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1
Caracterização microbiológica do sangue bovino

Amostra	Contagem Total	Coliformes totais (NMP)	Coliformes fecais (NMP)	Pesquisa de <i>Salmonella</i>
1	2,5 x 10 ² ufc/ml	5/ml	5/ml	ausência
2	1,5 x 10 ² ufc/ml	ausência	ausência	ausência
3	6,4 x 10 ufc/ml	2,4/ml	1,7/ml	ausência
4	8,8 x 10 ufc/ml	2/ml	2/ml	ausência
Média	1,4 x 10 ² ufc/ml	2,35/ml	2,18/ml	—
Intervalo de confiança*	0 a 3,2 x 10 ² ufc/ml	0 a 6,65/ml	0 a 6,53/ml	—

onde ufc = unidade formadora de colônia, NMP = número mais provável, * 95% de confiança

Os resultados obtidos mostraram que a contaminação nas diversas coletas foi baixa, mesmo quando se considera o intervalo de confiança pois podemos afirmar com 95% de certeza que a contagem está entre 0 e 315 ufc/ml. Segundo Ockerman & Hansen⁹, era esperada uma carga microbiana em torno de 2,5x10⁵/g para o sangue, bastante superior aos valores encontrado para as amostras coletadas. Comparando-se com os valores encontrados por Rossi Junior *et al.*¹² que obtiveram 2,6 x 10² ufc/ml na contagem padrão de mesófilos pôde-se observar que somente uma amostra apresentou resultado semelhante, sendo que em média os valores encontrados no presente trabalho foram inferiores ao encontrado por estes pesquisadores.

Os valores encontrados para coliformes totais no sangue apesar de baixos, com certeza de 95% de estarem no intervalo de 0 a 6,65/ml, são em média superiores aos valores encontrados por Rossi Junior *et al.*¹² que encontraram 0,38 coliformes totais por ml. No caso de coliformes fecais, os valores encontrados são inferiores aos encontrados por esses pesquisadores, que encontraram 10,0 coliformes fecais por ml, mesmo quando se conside-

ra o limite superior do intervalo de confiança obtido (6,53/ml). Não foi detectada a presença de *Salmonella sp.*

Os resultados levam a suposição que o sangue amostrado foi proveniente de animais sãos e que as condições de higiene de coleta pelo sistema aberto foram satisfatórias.

Embora não exista uma legislação específica para sangue bovino, é interessante ressaltar que a carga microbiana determinada encontra-se dentro da legislação para diversos alimentos, tais como massas alimentícias, pães, misturas para bolos e etc.

Plasma bovino

Os resultados obtidos nas determinações microbiológicas do plasma bovino, obtido por centrifugação, estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados obtidos nas diferentes amostras de plasma mostraram baixa contaminação. Segundo Ockerman & Hansen⁹, era esperada uma carga microbiana em torno de 1,0 x 10⁶/g para o plasma, e foram encontrados valores bem inferiores, mesmo quando se considera o intervalo de confiança, pois pode-se afirmar com 95% de certeza que a contagem está entre 0 e 1,7 x 10² ufc/ml.

TABELA 2
Caracterização microbiológica do plasma bovino

Amostra	Contagem Total	Coliformes totais (NMP)	Coliformes fecais (NMP)	Pesquisa de <i>Salmonella</i>
2	1,0 x 10 ² ufc/ml	< 1/ml	0	ausência
3	5,3 x 10 ufc/ml	3/ml	3/ml	ausência
4	8,4 x 10 ufc/ml	2/ml	2/ml	ausência
Média	8,0 x 10 ufc/ml	2/ml	1,67/ml	—
Intervalo de confiança*	0 a 1,7 x 10 ² ufc/ml	0 a 5,58/ml	0 a 7,16/ml	—

onde ufc = unidade formadora de colônia, NMP = número mais provável, * 95% de confiança

Rossi Junior *et al.*¹² encontraram $3,4 \times 10^3$ ufc/ml de bactérias mesófilas, nas amostras de plasma estudadas, demonstrando ter ocorrido um aumento na carga microbiana durante o processo de centrifugação do sangue. No presente trabalho esse fato não foi observado, indicando a possibilidade de uma centrifugação sem que ocorra aumento de contaminação.

Quanto a presença de coliformes totais e fecais, no presente trabalho foram encontrados valores em média inferiores aos observados por Rossi Junior *et al.*¹² que foram de 75/ml para coliformes totais e 6/ml para coliformes fecais. Somente quando se considera o limite superior do intervalo de confiança obtido para a presença de coliformes fecais é que foi observado um valor um pouco superior (7,16/ml)

Esta baixa carga microbiana indica que o processo de obtenção de plasma bovino foi bastante cuidadoso em termos de higiene tendo promovido a redução da carga microbiana. Provavelmente parte desta carga deve ter passado para a fração das hemáceas e, ainda, parte das células contaminantes podem ter sido rompidas durante o processo de centrifugação.

Ainda é interessante lembrar que mesmo não tendo sido efetuadas análises microbiológicas após o congelamento, dados de literatura sugerem que a carga microbiana tende a reduzir quando o plasma é submetido ao congelamento, e também com outros processos industriais, como secagem, desde que conduzidos sob condições mínimas de higiene^{1,10}.

No caso de se tornar rotina o emprego destes subprodutos nas formulações alimentícias para humanos,

serão adicionados conservantes, serão estocados sob congelamento ou refrigeração e ainda sofrerão algum tipo de tratamento térmico para obtenção do produto acabado, o que provavelmente acarretará em redução de carga microbiana.

Os resultados são promissores no sentido que o emprego deste material com cuidados básicos de higiene o torna tão processável quanto outros mais convencionais e aparentemente não oferece um risco maior de contaminação microbiana.

Naturalmente que para coleta em grande escala seria necessário adaptar os cuidados de higiene aqui considerados para adequar esta matéria-prima para uso em alimentação humana.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste trabalho, o sangue bovino, proveniente de um pequeno abatedouro na região Sul do Rio Grande do Sul, obtido por sistema de coleta aberto e o plasma bovino obtido por centrifugação deste apresentaram boas condições microbiológicas, o que indica a possibilidade de aplicação em alimentação humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a prof^a Dr^a Eliana Badiale Furlong pelos seus ensinamentos e orientação nas pesquisas que originaram esta publicação.

RIALA 07/839

SILVEIRA, A. E. V. G. da; GONÇALVES, A. A.; BITTENCOURT, C. R.; GOULART, G. A. S. & SALCEDO, A. M. — Microbiologic characterization of bovine blood and plasma to aim their utilization in food. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2):51-55. 1998.

SUMMARY: Bovine blood and plasma samples were microbiologically evaluated to aim the possibility of using this protein source in human food. Analysis of total aerobic bacterial counts, evaluation of most probable number of total and fecal coliform and *Salmonella sp.* search were performed. According to the low level of contamination found you can say that, for this actual work, the bovine blood and plasma presented conditions of use in food.

DESCRIPTORS: bovine blood, bovine plasma, microbiologic evaluation

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEDIN, D. M. *Revalorização do sangue de abate através de novos processos e novos produtos*. Campinas, 1987. 13 p. Seminário apresentado na Faculdade de

Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

2. BORGHESI, V. & AGUIRRE, S. del R. La sangre animal — una fuente potencial de proteínas para el consumo humano. Parte I. Recuperacion, tecnolo-

- gias de transformacion, valor nutricional y utilizacion. *Revista Alimentos*, 5(2), 1980.
3. DOMENE, S. M. A. Utilização do sangue bovino para alimentação humana. *R. Nutr. PUCCAMP*, 2: 163-179, 1988.
 4. DUARTE, R. M. T. *Obtenção de frações protéicas de sangue bovino*; composição, valor nutritivo e propriedades funcionais. Campinas, 1997. 90 p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) — Universidade Estadual de Campinas.
 5. GONÇALVES, A. A.; BADIALE — FURLONG, E. & SOUZA - Soares, L. A. Utilização de subprodutos da agroindústria na elaboração de um biscoito de aveia. *Vetor*, Rio Grande, v.7, p. 47 — 56, 1997.
 6. GRAHAM, A. The collection and processing of edible blood. *CSIRO Food Research*, 38(1): 16 — 22, 1978.
 7. ICMSF. *Microrganismos de los alimentos*. Técnicas de análises microbiológicas. v. 2, 2ª ed., Zaragoza, Editorial Acribia, 1983.
 8. LANARA. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos microbiológicos*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.
 9. OCKERMAN, H. W. & HANSEN, C. L. *Industrialización de subproductos de origen animal*. Zaragoza, Editorial Acribia, S. A., 1994. p. 387.
 10. PISKE, D. Aproveitamento de sangue de abate para a alimentação humana. I. Uma revisão. *Bol. ITAL*, Campinas, 19(3): 253-308, 1982.
 11. REVISTA NACIONAL DA CARNE, Ano XXII, nº 241, março, p. 81, 1997.
 12. ROSSI JUNIOR, O. D.; SANTOS, I. F.; NADER FILHO, A. & SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Estudo microbiológico do sangue e plasma bovino, obtidos em matadouro, utilizados na elaboração de produtos comestíveis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 46(1): 31-9, 1994.
 13. SALCEDO, A. M. *Potencial do plasma bovino adsorvido com farelo de arroz para uso em formulação de sobremesas*. Rio Grande, 1997. Projeto de Graduação em Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade do Rio Grande. 54 p.
 14. SILVEIRA, A. E. *Estudo de uma formulação alternativa de massas alimentícias: enriquecimento com plasma bovino*. Rio Grande, 1995. Projeto de Graduação em Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade do Rio Grande. 74 p.
 15. TEIXEIRA, Â. M; FURLONG, E. B. & MELLADO, M. M. S. Caracterização química funcional e microbiológica de sopas desidratadas formuladas a partir de plasma bovino adsorvido em farelo de arroz desengordurado. *Vetor*, Rio Grande, v. 6, p.85 — 93, 1996.
 16. TYBOR, P. T.; DILL, C. W. & LANDMANN, W. A. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. *Journal of Food Science*, 40: 155 — 159, 1975.

Recebido para publicação em 20/02/98

MAMMOMONOGAMUS LARYNGEUS, RYZHIKOV, 1948. OCORRÊNCIA DE
CASO HUMANO NO MUNICÍPIO DE JUNDIAÍ, SP, BRASIL.

Rosa Maria Donini Souza DIAS*
Ana Célia Steffen MANGINI*
Domingas M. A. Grispino Vieira TORRES*
& Evaldo MARCHI**

RIALA 07/839

DIAS, R. M. D. S., MANGINI, A. C. S., TORRES, D. M. A. G. V. & MARCHI, E. - *Mammomonogamus laryngeus*, Ryzhikov, 1948. Ocorrência de caso humano no município de Jundiaí, SP, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2) 57-60, 1998.

RESUMO: Os parasitas da superfamília Strongyloidea parasitam o trato respiratório de aves e mamíferos, e raramente, do homem. O objetivo do presente trabalho é relatar o encontro de vermes que foram retirados dos brônquios de uma paciente no Município de Jundiaí, Estado de São Paulo, que apresentou quadro inicial de tosse seca, seguida de tosse produtiva e sibilância. Após estudos morfológicos e biométricos, os vermes foram identificados como exemplares macho e fêmea de *Mammomonogamus (Syngamus) laryngeus*.

Os autores chamam a atenção para a possibilidade deste raro parasita ser responsável por perturbações das vias respiratórias de origem desconhecida e para a importância do diagnóstico laboratorial destes parasitas em nosso meio.

UNITERMOS: *Mammomonogamus laryngeus*; *Syngamus laryngeus*; Singamose humana; Diagnóstico clínico-laboratorial.

INTRODUÇÃO

Os vermes da família Syngamidae só esporadicamente têm sido descritos no homem, pois são parasitas normalmente encontrados no trato respiratório de aves e mamíferos como bovinos, ovinos, caprinos, cervídeos e felídeos, entre outros. A doença, singamose humana, foi descrita pela primeira vez, por Leiper, em 1913¹⁸. A espécie encontrada no homem foi descrita, primeiramente, como pertencente ao gênero *Syngamus* (Railliet, 1899)¹⁵. Em 1948, Ryzhkov criou o gênero *Mammomonogamus*, por considerar diferentes os parasitas infectando aves e mamíferos¹⁸. Atualmente, as espécies *Syngamus laryngeus* e *Mammomonogamus laryngeus* são consideradas sinônimas e os autores dão preferência a esta última classificação, mais atualizada.

Vermes do gênero *Mammomonogamus laryngeus*, são nematóides de coloração vermelha, por

serem hematófagos, sendo o macho bem menor que a fêmea, e quando acasalados se apresentam em forma de Y. A fêmea mede cerca de 13mm com vulva no segundo quarto do corpo e possui papila cervical. A cápsula bucal possui 8 dentes, sem coroa cuticular, parede grossa e nervuras na superfície interna. Os ovos possuem parede grossa, sem estrias evidentes, ovais de extremidades arredondadas; medem de 48 a 50 μ por 88 a 96 μ . Os vermes adultos se ligam à mucosa das vias aéreas superiores provocando prurido, secreção e tosse.

O ciclo ainda não foi elucidado no homem, mas acredita-se estar envolvido um hospedeiro intermediário, possivelmente um anelídeo ou artrópode¹⁸.

No Brasil foram descritos, desde o início do século, vinte e quatro casos.

Este trabalho tem como objetivo chamar a atenção para a ocorrência deste raro parasita, responsável por graves perturbações respiratórias no homem e levantar

* Seção de Enteroparasitoses – Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central

** Faculdade de Medicina de Jundiaí – SP

a possibilidade de aquisição da parasitose, através da inalação de ovos, que se encontrariam no solo ou na poeira, além da transmissão por ingestão de alimentos ou água contaminada com ovos do parasita eliminados por animais parasitados, já aceita por muitos autores.

RELATO DE CASO CLÍNICO

Uma paciente do sexo feminino, professora de educação física, moradora em Jundiá, Estado de São Paulo, com quadro inicial de tosse seca, seguida de tosse produtiva e sibilância não responsiva a tratamento clínico habitual, foi submetida à broncoscopia, apresentando bronquite intensa e notando-se no brônquio principal esquerdo a presença de vermes em movimento, firmemente aderidos à mucosa, que foram retirados sem dificuldade com pinça de biópsia. Os vermes foram enviados à Seção de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, onde foram examinados em microscópio estereoscópico e submetidos à estudos morfológicos e biométricos, para identificação e classificação.

RESULTADO

O exame em microscópio estereoscópico revelou tratar-se de vermes acasalados, em forma de Y, de coloração vermelha. Os vermes apresentavam cutícula estriada transversalmente, corpo grosso e cilíndrico, sendo o exemplar macho menor que a fêmea. A cápsula bucal se apresentava bem desenvolvida, e a extremidade cefálica medindo de 0,3 x 0,36 mm. O esôfago curto e claviforme e um anel nervoso eram visíveis em ambos os sexos. O macho, com cerca de 4,5 mm, se encontrava aderido, através da bolsa copuladora, situada na extremidade posterior do corpo, à vulva, situada no fim do primeiro terço do corpo da fêmea, que media 13,5 mm. O casal foi identificado como vermes pertencentes ao gênero *Mammomonogamus*, espécie *laryngeus* (Ryzhikov, 1948) (Fotos 1 e 2).

A paciente foi medicada com albendazole, dose única e após 30 dias da retirada dos vermes, em nova avaliação do quadro, apresentou-se sem nenhuma queixa.

DISCUSSÃO

A revisão da literatura (quadro 1) revela que os 23 casos de singamose humana, relatados no Brasil anteriormente, foram: 1 na Bahia, 1 em Pernambuco, 1 no Paraná, 2 em Minas Gerais, 4 em São Paulo, 4 no Rio de Janeiro, 4 no Rio Grande do Sul e 6 em Santa Catarina.



Foto 1 - Extremidade anterior (visão da cápsula bucal) de *M. laryngeus*.



Foto 2 - Casal de *M. laryngeus* em cópula.

Mammomonogamus laryngeus são parasitas responsáveis por perturbações das vias respiratórias, apresentando quadros sem causa aparente, mas com sintomas muitas vezes alarmantes que desaparecem com a retirada dos vermes, ou pela eliminação dos mesmos espontaneamente, num acesso de tosse. Devido aos poucos casos humanos descritos, este parasita não teve seu ciclo biológico elucidado no homem. Amaral et al.¹, já em 1954, alertavam sobre a possibilidade de se tratar da mesma espécie que parasita mamíferos. Nestes, a infecção parece ocorrer pela ingestão de ovos com larvas infectantes, que em seguida migram para os brônquios ou traquéia, onde os vermes atingem a maturidade, e permanecem acasalados permanentemente. Severo et al.¹⁷ sugerem passagem pulmonar no ciclo do nematóide. Timmons et al.¹⁸ sugerem que a aquisição da parasitose possa ocorrer pela ingestão acidental de água ou alimentos contaminados com

Autor	Ano	Cidade/Estado	Nº	Sexo/Idade
Travassos ¹	1921	Salvador – BA	1	masculino
Mello & Mello ^{3,11}	1938	Rio de Janeiro – RJ	1	feminino,20
Lent & Penna ⁶	1939	Rio de Janeiro – RJ	1	feminino,59
Moraes ¹³	1947	Rio de Janeiro – RJ	1	feminino
Passos & Barbosa ¹⁴	1948	Rio de Janeiro – RJ	1	feminino,45
Lima & Barbosa ⁷	1951	Recife – PE	1	feminino
Amaral et al. ¹	1954	Tremembé – SP	1	feminino,63
Machado de Mendonça et al. ¹⁰	1962	Belo Horizonte – MG	1	Não informado
Londero & Lauda ⁸	1967	Santa Maria – RS	1	feminino,51
Melo et al. ¹²	1983	Belo Horizonte – MG	1	feminino,32
Busetti et al. ²	1983	Paulo Frontin – PR	1	masculino
Santos et al. ¹⁶	1986	São Paulo –SP	1	feminino,75
Severo et al. ¹⁷	1988	N. Hamburgo e Sta Maria – RS	2	feminino,51 e 42
Zunino et al. ²⁰	1989	Florianópolis – SC	6	não informados
Freitas et al. ⁴	1995	Santa Maria – RS	1	masculino,33
Correa de Lara et al. ³	1993	Botucatu – SP	2	feminino,22 e 65
Dias et al	1997	Jundiá – SP	1	feminino

QUADRO I: Casos de parasitismo humano por *M. laryngeus* descritos no Brasil.

ovos do parasita ou com o próprio hospedeiro intermediário infectado, pois esta é uma via de infecção comum para diferentes espécies de parasitas em mamíferos; sugerem que o hospedeiro intermediário deve ser pequeno e passar despercebido em alimentos crus ou mal cozidos. Londero et al.⁸ chamam a atenção para o fato desta parasitose acometer, na maioria dos casos, pacientes do sexo feminino. Em revisão da literatura, verificou-se que dos 24 casos descritos no Brasil, considerando este inclusive, 14 pacientes são do sexo feminino, 3 do sexo masculino e 7 não informaram o sexo do indivíduo.

Existem casos de singamose que foram diagnosticados através da broncoscopia^{2,3,17,18} e outros pelo encontro dos vermes expelidos em acesso de tosse^{3,4,7,8,16,20}. Por outro lado, há relatos de casos onde houve encontro de ovos de *M. laryngeus* no escarro^{1,17,20} e encontro de ovos nas fezes^{2,3,17,20}. Alguns autores chamam a atenção sobre observação de pontos vermelhos hemorrágicos na parte posterior da

hipofaringe^{6,9,11,14}. Gardiner et al.⁵ descrevem caso nos EUA, onde o diagnóstico foi realizado através de cortes histológicos.

No presente relato, quinto descrito no Estado de São Paulo, a paciente, professora de educação física, ficando muitas vezes, devido às suas atividades, próxima ao solo, poderia ter inalado ovos do parasita que se encontravam ali presentes. Esses ovos, com larva infestante, encontrando na árvore respiratória condições propícias, continuariam seu ciclo de desenvolvimento.

Os autores acreditam que muitos casos de singamose não sejam diagnosticados por falta de exame cuidadoso através de broncoscopia, pois raramente distúrbios do trato respiratório levantam suspeita da presença de parasitas. Como o exame microscópico realizado é elucidativo nestes casos, associado à existência de terapêutica eficaz, que elimina a queixa, os autores enfatizam a necessidade dos clínicos lembrarem da ocorrência da infecção humana por *M. laryngeus*.

RIALA 07/839

DIAS, R. M. D. S., MANGINI, A. C. S., TORRES, D. M. A. G. V. & MARCHI, E. - *Mammomonogamus Laryngeus*, Ryzhikov, 1948. Ocorrência de caso humano no município de Jundiá, SP, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2) 57-60, 1998.

SUMMARY: *Mammomonogamus laryngeus*, Ryzhikov, 1948: A new brazilian human case. *Mammomonogamus (Syngamus) laryngeus*, common parasite of upper respiratory tract at birds and mammals, unusually parasites the man. The new case of syngamosis in Brazil is described. The patient was a woman with a history of persistent and chronic cough and by bronchoscopy was removed two parasites, a couple, that were identified as *M. laryngeus*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2):55-58, 1998.

KEYWORDS: *Mammomonogamus laryngeus*; *Syngamus laryngeus*; human syngamiasis; Clinic-laboratorial diagnosis.

BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, A.D.F.; QUAGLIA, F.O. & INOUE, C.R. – Sobre novo caso de singamose humana. Rev. méd. S. Paulo, 38: 1-9, 1954.
2. BUSETTI, E. T.; SOCCOL, V. T. ; RUIS, M. C. E. & CHRISTO, S. W. – *Mammomonogamus laryngeus* (Syngamidae). Ocorrência parasitária no homem. In: VI Congresso de la Federación Latinoamericana de Parasitólogos, VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia & V Jornada Paulista de Parasitologia, São Paulo, 1983. Resumos p.105.
3. CORREA DE LARA, T. A.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.R.; GODOY, I. & QUELUZ, T.T. – Human syngamosis. Two cases of chronic cough caused by *Mammomonogamus laryngeus*. CHEST, 103: 264-265, 1993.
4. FREITAS, A.L.; DE CARLI, G. & BLANKENHEIN, M.H. – *Mammomonogamus (Syngamus) laryngeus* infection: a new brazilian human case. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 37:177-179, 1995.
5. GARDINER, C. H. & SCHANTZ, P. M. – *Mammomonogamus* infection in a human. Report of a case. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32: 995-997, 1983.
6. LENT, H. & PENNA, M. – Novo caso de singamose em homem no Brasil. Hospital (Rio de Janeiro), 16: 111-118, 1939.
7. LIMA, L.I.A. & BARBOSA, F.S. – Considerações em torno de um caso de singamose humana. Publ. Avul. Inst. Aggeu Magalhães, 1: 27-34, 1951.
8. LONDERO, A.T. & LAUDA, P. – Infecção humana por *Syngamus laryngeus*. Hospital (Rio de Janeiro), 72: 329-331, 1967.
9. MACHADO, O. – Sobre *Syngamus laryngeus* (caracteres dos exemplares encontrados em um caso de singamose no homem). Bol. Inst. Vital Brasil, 22: 61-68, 1938.
10. MACHADO DE MENDONÇA, J.; DAVIDSON, S. & LOURES, J.C. – Mais um caso de singamose humana. Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro, 6: 18-20, 1962.
11. MELLO, M. & MELLO, S. – *Syngamus laryngeus* no homem. Rev. Flum. Med., 3: 457-460, 1938.
12. MELO, A. L.; TEIXEIRA, A. S. ; GUERRA, A. F. M.; FORTINI, M. S. & FULGÊNCIO, M. S. T. – Parasitismo da rinofaringe pelo *Syngamus laryngeus*. J. bras. Med., 46: 94-96, 1984.
13. MORAES, R. G. – Parasitismo humano pelo *Syngamus laryngeus*. Arch. bras. Med., 37: 97-101, 1947.
14. PASSOS, W. & BARBOSA, N. C. – *Syngamus laryngeus* na espécie humana. Rev. bras. Med. , 5: 340, 1948.
15. RAILLIET, M. A. – *Syngamus laryngeus* du boeuf. C. R. Soc. Biol. (Paris), 51: 174-176, 1899.
16. SANTOS, V. A.; VILLELA, M. S. H. & SERRA, R. G. – Ocorrência de um novo caso de singamose humana em São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 28: 358- 363, 1986.
17. SEVERO, L.C.; CONCI, L. M. A.; CAMARGO, J. J. P.; ANDRE-ALVES, M. R. & PALOMBINI, B.C. – Syngamosis: two new Brazilian cases and evidence of a possible pulmonary cycle. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. , 82: 467-468, 1988.
18. TIMMONS, R.F.; BOWERS, R. E. & PRICE, D. L. – Infection of the respiratory tract with *Mammomonogamus (Syngamus) laryngeus*: a new case in Largo, Florida and a summary of previously reported cases. Am. Rev. Respir. Dis, 128: 566- 569, 1983.
19. TRAVASSOS, L.- Notas helmintológicas. Brasil Méd., 35:67, 1921.
20. ZUNINO, J.N.; MORITZ, D.E.; ZOCCOLI, C. M. & BARTH, V.L. – Descrição de 6 casos de singamose em Florianópolis. In: XXV Congresso da Soc. Bras. de Medicina Tropical, Florianópolis, 1989. Resumos, p. 213.

Recebido para publicação em 06/03/98

LABELING EFFICIENCY OF MONOCLONAL ANTIBODY OF EPITHELIAL ORIGIN TUMOURS USING DIFFERENT CHELATING AGENT (MDP)

Heidi Pinto MARTINS *
Elena S. HAMADA**
NORMANDO E. Iznaga Escobar***

RIALA 07/840

MARTINS, H. P.; HAMADA, E.S.; NORMANDO, E. I. E. - Labeling Efficiency of monoclonal antibody of epithelial origin tumours using different chelating agent (MDP). Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 61-63, 1998.

ABSTRACT: The epidermal growth factor (EGF) is a little polypeptide of 6kD MW capable of stimulation the proliferation of epithelial cells and performs this biological activity through a membrane receptor, a 1186 aminoacid glycoprotein of 170 kD MW. This receptor (EGF-R) in high levels have been detected in malignant tumours of epithelial origin, i.e., breast, ovary, vulva, esophagus, colon and lung tumours.

The anti EGF receptor monoclonal antibody, ior-egf/r3 (Cuba) is an IgG2a isotype was labeling with ^{99m}Tc . The reduction step was performed with 2-mercaptoethanol at a molar ratio of 1:1000 (2-ME:MAB) The integrity of reduced MAB was checked by gel filtration chromatography on Sephadex G-25 minicolumn (1 X 10 cm). The MAB pyke was submitted to two types of methylen diphosphonate as chelant: Amerscam Medronate II Bone Agent MDP kit (Amersham, UK) and IPEN/CNEN MDP kit, and both were labeled with 1 mCi (37 MBq) of ^{99m}Tc eluted from $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator system (IPEN/CNEN-SP). The purification in ITLC reveals the high grade of labeling monoclonal antibody.

The laboratory tests did not show significant modification in structure of MAb - ^{99m}Tc macromolecule in both cases and can be used in immunoscintigraphy.

DESCRIPTORS: Monoclonal antibody ; Chelating Agent; Radiolabelling

Work supported by CNPq

I. INTRODUCTION

It is impossible to relate in detail all of the aspects and all of the centers where monoclonal antibodies (MAbs) is and was used. The first antibodies used were purified polyclonal anti-CEA antibodies raised in goats and labeled with ^{131}I . At the time, little was known on acute and long-term toxicity of goat proteins administered intravenously in patients. Today, we known that this is not a favorable situation for tumour detection with MAbs.

After some years of reluctance and a tendency towards the use of longer-lived radionuclides, technetium- 99m has now become established as the radiolabeled of choice for imaging with monoclonal antibodies (1-3).

In these applications technetium- 99m has almost replaced others radionuclides due to its nuclear properties and its availability from a generator (4).

There are two different methods available for radiolabeling MAb, with ^{99m}Tc : a direct method reacting the reduced antibody directly with reduced technetium (5,6,7) and indirect an method where a bifunctional chelating agent is first conjugated with an antibody (8,9). Direct methods are efficient and adaptable to a kit type of radiolabeling procedure.

Direct methods are efficient and adaptable to a kit type of radiolabeling procedure.

* Seção de Imunologia - Instituto Adolfo Lutz-SP — Av. Dr. Arnaldo 355 11 andar CEP 01236-902

** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP .

*** Center of Molecular Immunology-CIM PO Box 16040,11600, Havana, Cuba

Further more the use of a reducing agent may affect immunoreactivity of the reduced antibody and the labeled antibody could be unstable. The direct method for radiolabeling reduced MAb with ^{99m}Tc in presence of methylene diphosphonate (MDP), developed by Schwarz and Steinstrasser (10) and Mather and Ellison (11) has proved as a good procedure to obtain high labeling efficiency and a stable labeled MAb. The ^{99m}Tc -MDP method uses reduction of disulfite bridges of the immunoglobulin molecule by adding an excess of reducing agent (2-ME). After purification to eliminate the excess of 2-ME in Sephadex G-25 column, the reduced antibody is labeled with technetium via Sn^{2+} reduction of pertechnetate, using MDP as weak competing ligand.

Nevertheless the use of different types of MDP kits is necessary to minimize the damage caused in a whole immunoglobulin macromolecule (or your fragments).

II. MATERIAL AND METHODS

Antibody. The monoclonal antibody ior-egf/r3 is a highly specific murine IgG2a isotype that recognizes the hEGF-r. It was obtained and produced in the Center of Molecular Immunology (Havana, Cuba) by standard hybridoma techniques as previously described (12) in vials containing 1 mL of sterile and apyrogenic solution with an antibody concentration of 5mg/mL were used.

Antibody reduction. 1 mL (5mg/ml) of MAb was reduced by reaction with a molar excess of 2-ME of 1:1000 (4,8 ug of 2-ME: 5 mg of Ab) at room temperature for 30 minutes. The reduced antibody was purified to eliminate the excess of 2-ME on a PD-10 Sephadex G-25 gel filtration column where was applied 1 mL of antibody and washing with saline purged nitrogen and the eluates were collected in 2 mL vial and the protein pike was determined by spectrophotometer UV (Beckman) at 280 nm.

Labeling. After reduction of internal disulfite bonds the (2-ME) and purification the reduced antibody was labeled with technetium via Sn^{+2} and MDP kits were reconstituted with 5 mL of saline purged with nitrogen to Amerscan and 3 mL for IPEN/CNEN-SP; 50 uL were added to each mg of reduced antibody and they were labeled with 40 mCi of pertechnetate eluted from $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator (IPEN/CNEN-SP).

Quality Control . The labeled MAb was submitted to ascending ITLC strips (1 X 10 cm) chromatography like stationary phase and three systems , acetone, saline as mobile phase; that strips were soaked in 1% human albumin and after dried samples of 1 uL were applied at origin. Radioactivity bound to antibody remained at the origin (saline) whereas free pertechnetate and ^{99m}Tc -MDP migrated with the mobile phase. Strips were also cut and counted in a gamma counter.

III. RESULTS

Reduced monoclonal antibody was analyzed on a PD-10 Sephadex G-25 gel filtration column. Absorbance values at 280 nm revealed the protein pike (Table 1). The ability of the reduced monoclonal antibody to label with ^{99m}Tc was assessed and the best conditions were selected to add MDP solution and 1 mCi of ^{99m}Tc ; no have different results with different MDP (Table 2).

The labeling efficiency demonstrated the high grade of Tc incorporation to the antibody macromolecule in three different systems of ITLC chromatography.

TABLE 1
D.O. (280 nm) of 2 mL fractions eluted from PD- 10
Sephadex G-25 column

Volumes	D.O.
2 mL	.60
4 mL	.10
6 mL	.06
8 mL	.16

TABLE 2
Scheme and out-put in labeling antibody

	Saline
MDP (Amerscan)	97,2%
MDP (IPEN/CNEN-SP)	97,5%

IV. DISCUSSION AND CONCLUSION

The objective of the present work was to evaluate the prepare of the ^{99m}Tc -monoclonal antibody, designed ior egf/r3 (Cuba), by reducing their antibodies as potential imaging agents for various human epithelial producing malignant tumours.

The EGF/r antigen has the potential as a target for imaging and therapy because of its abundance an uniformity of expressions in most EGF-producing tumours. Even though others factors such as the monoclonal antibody characteristic , the antibody delivery, and the tumour biology may be involved in limiting tumour targeting, the antigenic content of tumours has a positive correlation with uptake of monoclonal antibodies in vivo.

The studies with ^{99m}Tc -monoclonal antibodies were hampered by their stability of the ^{99m}Tc labeling and characterized by considerable accretion of activity in the kid-

ney. Advances in chelate technology have resulted in substantial improvement in the stability of the ^{99m}Tc labeling, which has been translated into reduced kidney uptake in vivo (14,15). Recently, several investigators have demonstrated that ^{99m}Tc -labeled antibody and antibody fragments can be directly prepared if the antibody is first exposed to reagents such as 2-mercaptoethanol (2-ME) or 2-aminoethanethiol, which reduce intrinsic disulfite bridges. The reduced antibody is labeled with transchelation in presence of stannous ion, using ^{99m}Tc and phosphonate-type bone imaging radiopharmaceuticals.

In this work, we have adapted the original direct method (11) so as to label ior-egf/r3 with technetium. No significant difference existed between MDP kits, because it seems likely, therefore, that the majority of the labeling is mediated through the exposed-sulphydryl groups and not with other amino-acid side chains. The sulphydryl groups on the antibody molecule are bound to the technetium ion. Although transchelation by cysteine solution occurred slowly, this bound may play an important role in both the in vitro and in vivo stability; It is generally admitted that technetium must be reduced to the +3, +4 or +5 valence state to be incorporated into a protein (16).

In conclusion, the results of these molecule stability suggest that the binding site of ^{99m}Tc is mainly a constant region and ITLC chromatography analyzes showed no monoclonal antibody damage when two different types of transchelation were used whereas they had prevent the oxidation of the reduced antibody and the action of stannous ion was the only reduction of ^{99m}Tc -pertechnetate, and not serve as ligament between ^{99m}Tc and antibody.

REFERENCES

1. REILLY R.M., **Immunoscintigraphy of tumours using Tc-99m labelled monoclonal antibodies: a review.** Nucl. Med. Commun. 14:347-359, 1993
2. GRANOWSKA M., BRITTON K.E., MATHER S.J., MORRIS G., ELLISON D., SOOBROMONEY S., TALBOT I.C. and NORTHOVER J.M.A., **Radioimmunoscintigraphy with Tc-99m labeled monoclonal antibody, IA3, in colorectal cancer.** Eur. J. Nucl. Med. 20:690-698, 1993
3. GRANOWSKA M., BRITTON K.E., MATHER S.J., LOWE D.G., ELLISON, D. BOMANJI J., BURCHELL J., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., HUDSON C.R. and SHEPHERD J.H. **Radioimmunoscintigraphy with technetium-99m-labelled monoclonal antibody, SM3, in gynaecological cancer.** Eur. J. Nucl. Med. 20:483-489, 1993
4. MORRISON R.T., LYSTER D.M., and ALCORN L. **Radioimmunoimaging with 99m Tc monoclonal antibodies: clinical studies.** Int. J. Nucl. Med. Biol. 11:184-188, 1984
5. ALAUDDIN M.M., LESLIE A.K. and EPSTEIN A. L. **An improved method of direct labeling monoclonal antibodies with 99m Tc.** Nucl. Med. Biol. 19 (4) : 445-454, 1992
6. COLLOMBETTI L.G., GOLDMAN J., and PATEL G.C. **A rapid method for labeling IgG with 99m Tc.** J. Nucl. Med. 20: 652, 1975
7. RHODES B.A.; TORVESTAD D.A. and BRESLOW K. **99m Tc labeling and acceptance testing of radiolabeled antibodies and antibody fragments in tumor imaging.** Edited by Burchiel S.W. and Rhodes B.A. 111-123, 1982 Mason New York
8. ALAUDDIN M.M.; NAHAFFI A. and SIEGEL M. **Synthesis and evaluation of a new bifunctional chelating agent TMED for antibody labeling with 99m Tc.** Antibody Immunoconj. Radiopharm. 3:41, 1990
9. FRANZ J.; VOLKERT W.A. and BARIFIED E.K. **The production of 99m Tc-labeled conjugated antibodies using a cyclam-based bifunctional chelating agent.** Nucl. Med. Biol. 14: 569-572, 1987
10. SCHWARZ A. and STEINSTRASSER A. **A novel approach to 99m Tc-labeled monoclonal antibodies.** J. Nucl. Med. 28: 721(Abstract), 1987
11. MATHER S.J. and ELLISSON D. **Reduction mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibody.** J. Nucl. Med. 31: 692-697, 1990
12. FERNANDEZ A., PÉREZ R., MACIAS A. and VELOSO A. **Generación y caracterización primaria de anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico.** Interferón y Biotecnología 6(3):569-572, 1989
13. IZNAGA-ESCOBAR N., MORALES A. and NÚÑEZ G. **Micromethod for quantification of SH groups generated after reduction of monoclonal antibodies.** 23: 641-646, 1996
14. HAWKINS E.B., PANT K.O. and RHODES B. A. **Resistance of direct 99m-Tc-protein bond to transchelation.** Antib. Immunol. Radiopharm. 3: 17-25, 1990.
15. RHODES B.A. **Direct labeling of proteins with 99mTc.** Nucl. Med. Biol. 18: 667-676, 1991 .
16. KUROKI M., KOGA Y. and MATSUOKA Y. **Purification and characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces.** Cancer Res, 41: 713-720, 1981.

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. II. UTILIZAÇÃO DE ANTÍGENO PARTICULADO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM INQUÉRITO CANINO EM REGIÕES ENDÊMICAS *

José Eduardo TOLEZANO **
Helena Hilomi TANIGUCHI **
Maria de Fátima Lerenó de ARAÚJO **
Márcia da Conceição BISUGO **
Elaine Aparecida CUNHA **
Carlos Roberto ELIAS **
Rui LAROSA **

RIALA 07/841

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BISUGO, M.C.; CUNHA, E.A.; ELIAS, C.R. & LAROSA, R. - Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. II. Utilização de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em inquérito canino em áreas endêmicas. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 65-71, 1998.

RESUMO: Vários pesquisadores tem questionado sobre o papel que animais domésticos poderiam estar exercendo, particularmente como fontes de infecção para o homem em áreas de transmissão para Leishmaniose Tegumentar Americana nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. No Espírito Santo tem sido confirmada a participação de cães como "reservatórios" de *L. (V.) braziliensis* na antiga zona de cobertura de mata atlântica, encontrando taxas de infecção bastante elevadas, em torno de 17% dos cães. No Estado de São Paulo, existe esta mesma preocupação, em relação à fontes de infecção representadas, possivelmente, por cães. Neste estudo foram realizados dois inquéritos para a pesquisa de infecção por *Leishmania* em populações caninas em áreas de transmissão de LTA nos municípios de Itupeva (região de Jundiá) e Eldorado (região do Vale do Ribeira). Pela primeira vez, foi utilizado um teste intradérmico (TIDR) com antígeno particulado de *L.(V.) braziliensis* e, em paralelo reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígenos de *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) chagasi* e *L.(L.) amazonensis*. Em Itupeva, dos 56 cães inquiridos, 10 (17,86%) foram reativos para, pelo menos, uma das reações, quando admitido qualquer valor de reatividade. Já em Eldorado, 6 (7,8%) dos 77 cães examinados revelaram alguma reatividade, porém com valores inferiores a 5mm ou 1:40, respectivamente para a TIDR e RIFI. Esses resultados indicam como bastante promissora e exequível, em condições de trabalho de campo, a utilização do TIDR para triagem de infecção natural por *Leishmania (V.) braziliensis* em animais domésticos suspeitos de alguma importância como fonte de infecção. Parece, também, ser pouco provável a participação de cães na manutenção do parasita em Eldorado. Todavia os resultados obtidos em Itupeva reforçam a necessidade de esclarecimento do papel dos cães na circulação de *Leishmania*. Tais resultados poderão ser fundamentais para a definição de estratégias de controle.

DESCRITORES: Leishmaniose Tegumentar Americana; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; reservatórios naturais; fontes de infecção; antígeno particulado; teste intradérmico; inquérito canino.

INTRODUÇÃO

Sob a denominação de Leishmanioses enquadram-se doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*³³.

Em sua maioria, as Leishmanioses são consideradas zoonoses, sendo as espécies de *Leishmania*, primariamente parasitas de animais silvestres e, menos freqüentemente, de animais domésticos^{18,26,29,33}.

* Apoiado pelo PCDEN/FNS-Ministério da Saúde.

** Seção de Parasitoses Sistêmicas - Instituto Adolfo Lutz.

No Novo Mundo, até o presente momento, pelo menos 14 diferentes espécies de *Leishmania* já foram encontradas infectando o homem¹⁹.

Nas Américas, as formas clínicas tegumentares causadas por tais agentes são referidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). No Brasil, a LTA adquire grande importância como problema de Saúde Pública, quer pela extensa distribuição geográfica, quer pelo crescente número de novos casos (mais de 280.000 casos nos últimos 15 anos, segundo a Fundação Nacional de Saúde (CCZAP-Coordenação e Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos/CNDS-Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária/CENEPI-Centro de Epidemiologia/ DEOPE-Departamento de Operações), quer pelo acentuado grau de destruição tecidual observado nas lesões cutâneas ou nas mucocutâneas³³.

O Estado de São Paulo convive com a autoctonia da LTA desde, pelo menos, 1895^{32,33}. Logo cedo, em São Paulo, foi reconhecida a necessidade de contato entre o homem e o ambiente florestado para a ocorrência da doença, razão pela qual BRUMPT & PEDROSO, em 1913, propuseram a denominação de "Leishmaniose Americana das Florestas"⁸.

Após a primeira metade deste século, diversos pesquisadores vem chamando a atenção para uma profunda alteração no padrão epidemiológico da LTA, particularmente nas regiões de colonização antiga, onde o ambiente já se encontra extremamente alterado, com drástica redução da cobertura vegetal original^{19,21,34}. Nessas circunstâncias verifica-se a perda do caráter ocupacional atribuído para a LTA nos tempos das populações pioneiras no início do século³⁴.

Tem sido assinalado um total desconhecimento do(s) reservatório(s) silvestre(s) de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o agente etiológico predominante em todas essas regiões de colonização antiga. Não tem sido incomum, todavia, o encontro de animais domésticos infectados pelo parasita, sendo mesmo possível a especulação sobre o papel destes animais como fontes de infecção para o(s) flebotômico(s) vetor(es)^{1,6,9,11,12,21,22,24,28,30,33}. Em algumas regiões endêmicas do Brasil e da Venezuela, as taxas de infecção em cães oscilam entre 3 e 23% e, entre eqüinos até 30%^{3,7,11,27,30,31}.

Com o desenvolvimento de um "kit" constituído de antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis* para a execução de testes intradérmicos em hospedeiros vertebrados não humanos^{3,22}, tornou-se possível, em áreas endêmicas, a utilização de uma importante ferramenta para avaliações epidemiológicas ou mesmo para diagnóstico individual.

Como parte de uma estratégia que pretende conhecer o papel desempenhado por animais domésticos, especialmente cães, como fontes de infecção de *L. (V.) braziliensis*, no presente trabalho foram realizados

inquéritos epidemiológicos em populações caninas de duas regiões endêmicas para LTA no Estado de São Paulo, uma no município de Itupeva (Bairro Guacuri), na região de Jundiá e outra no município de Eldorado (Bairro André Lopes), na região do Vale do Ribeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Regiões de Estudo — 1. REGIÃO DE SAÚDE DE JUNDIAÍ — MUNICÍPIO DE ITUPEVA — BAIRRO GUACURI. Área de recente identificação de focos naturais de transmissão de LTA no Estado de São Paulo. A região do planalto paulista apresenta morros com afloramentos rochosos e vegetação natural do tipo floresta mesófila semidecídua e de reflorestamento constituído por pinheiros e eucaliptos. O clima predominante é do tipo mesotérmico seco. O Bairro Guacuri é caracterizado pela predominância de sítios e chácaras com a presença permanente de caseiros e outros trabalhadores com suas respectivas famílias.

2. REGIÃO DE SAÚDE DE REGISTRO — VALE DO RIBEIRA — MUNICÍPIO DE EL Dorado — BAIRRO ANDRÉ LOPES. Área pertencente ao chamado limite sul da expansão da LTA no Estado de São Paulo, com focos naturais de transmissão registrados desde 1956¹⁴. Neste município tem sido registrados alguns dos mais altos coeficientes de incidência da LTA em São Paulo. O clima é quente e úmido, com vegetação natural do tipo floresta tropical úmida de altitude, mata atlântica tipo perenifolia higrófila, sendo que em alguns pontos a luxuriante vegetação foi completamente substituída pelas atividades agrícolas, com destaque para a bananicultura, base econômica de grande parte da região do Vale do Ribeira. A pluviosidade anual é elevada, ultrapassando 1.500 mm. Altitude média de 80 m acima do nível do mar.

Populações caninas estudadas — Uma vez informada a população local sobre os objetivos dos inquéritos propostos, foram inquiridos os animais cujos proprietários concordaram em participar do estudo.

1. Bairro Guacuri — município de Itupeva — Total de 56 cães.

2. Bairro André Lopes — município de Eldorado — Total de 77 cães.

Metodologias utilizadas — Os cães foram inquiridos pela aplicação de teste intradérmico (TIDR) e realização de reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

TIDR — Este teste foi realizado pela utilização de antígeno particulado, fração P10000G obtida do fracionamento subcelular de *Leishmania (V.) braziliensis*, cepa

MHOM/BR/75/M2903, preparado segundo metodologia previamente descrita^{5,22,23}. Uma dose deste antígeno P10000 *Leishmania (V.) braziliensis*, com 200µg de proteína em salina mertiolatada 1:10000, foi aplicada por via intradérmica na face interna da pata posterior esquerda em cada animal inquirido. O TIDR foi avaliado 48h após sua aplicação, sendo registrado qualquer valor de reatividade (enduração) igual ou superior a 3 mm, porém foi considerado positivo o teste com reação igual ou superior a 5 mm, tal como proposto por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS²². Controles positivo e negativo foram representados por hamsters experimentalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* e sem infecção, respectivamente.

RIFI — Esta reação foi realizada em soro sanguíneo de amostra de sangue colhida simultaneamente com a aplicação do TIDR de cada animal incluído nos inquéritos, sendo investigada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* com conjugado anti-IgG de cão, marcados com isotiocianato de fluoresceína. As amostras de soro foram examinadas pela RIFI em quadruplicata, cada reação com uma diferente amostra de *Leishmania*, sendo utilizada como antígeno. Foram preparados antígenos com cepas de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 e MHOM/BR/93/IAL-ITUPEVA, cepa de DD-8 de *L. (L.) chagasi* e cepa Ph-8 de *L. (L.) amazonensis*. As amostras de soro foram ensaiadas em diluições dobradas a partir de 1:10, sendo registrados quaisquer valores de reatividade, porém considerados positivos aquelas amostras com títulos iguais ou superiores a 1:40. Foram utilizadas sempre amostras controle positivas e negativas.

RESULTADOS

Uma primeira observação a ser registrada é a da ausência de lesões ulceradas que pudessem sugerir Leishmaniose Cutânea nos cães inquiridos por este estudo, apenas manchas hipocrômicas foram verificadas em alguns animais.

Na Tabela estão sumarizados os resultados obtidos ao TIDR e à RIFI para as duas regiões.

Em Itupeva, no Bairro Guacuri, dos 56 cães, 10 (17,9%) foram reativos se considerados todos os valores de reatividade, para qualquer dos testes imunodiagnósticos. Apenas um animal apresentou, simultaneamente, reação de hipersensibilidade tardia (TIDR) com 10 mm e título de anticorpos (RIFI) 1:20 em níveis de positividade. Um outro cão com RIFI 1:80 foi não reativo ao TIDR.

Quando considerados apenas os valores de reatividade iguais ou maiores que 5 mm ao TIDR e 1:40 na RIFI, 4 (7,1%) cães puderam ser reconhecidos como positivos para uma das reações (75%) ou para ambas as reações (25%).

No município de Eldorado, dos 77 cães, apenas 2 (2,6%) foram reativos ao TIDR, ambos com enduração inferior à 5 mm, 4 (5,2%) outros cães apresentaram reatividade à RIFI, porém todos com títulos de anticorpos menor ou igual a 1:20.

Os resultados verificados na RIFI foram 100% concordantes qualquer que tenha sido a espécie de *Leishmania* utilizada como antígeno.

TABELA — RESULTADOS DO TESTE INTRADÉRMICO (TIDR) COM ANTÍGENO PARTICULADO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* E DA REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) OBTIDOS NOS INQUÉRITOS CANINOS REALIZADOS EM ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, NOS MUNICÍPIOS DE ITUPEVA (REGIÃO DE JUNDIAÍ) E ELDORADO (REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA), NO ESTADO DE SÃO PAULO.

MUNICÍPIO	CÃES EXAMINADOS	TESTE INTRADÉRMICO (TIDR)			REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)				
		3-4 MM	≥ 5 MM	SUBTOTAL ≥ 3mm	NÃO REATIVOS (sem enduração)	REAGENTES	NÃO REAGENTES		
						1:80	1:20	1:10	
ITUPEVA*	56	4(7,1%)	3 (5,4%)	7 (12,5%)	49 (87,5%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)	2 (3,6%)	52 (92,8%)
ELDORADO	77	2 (2,6%)	0	2 (2,6%)	75 (97,4%)	0	1 (1,3%)	3 (3,9%)	73 (94,8%)

* Um único cão mostrou reatividade simultânea na RIFI e TIDR.

DISCUSSÃO

É consenso entre os pesquisadores que as Leishmanioses Tegumentares devam ser consideradas, em sua maioria, como zoonose, primariamente de animais silvestres^{18,26,29,30,33}. A primeira comprovação científica, sobre o envolvimento de roedores silvestres na circulação de *Leishmania* em áreas endêmicas para LTA se deu em 1957, no Novo Mundo¹⁷. Hoje, são reconhecidas mais de 40 espécies de mamíferos silvestres, nas Américas, como hospedeiros não humanos e/ou reservatórios naturais de *Leishmania*, em sua grande maioria pequenos roedores, edentados e marsupiais, além de alguns representantes carnívoros e primatas^{13,20}. Todavia, o encontro de animais silvestres naturalmente infectados, muitas vezes, constituem-se em eventos raros, principalmente em áreas de circulação de *L. (V.) braziliensis*. Nessas regiões, quando são isoladas amostras de *Leishmania* de animais silvestres, uma vez caracterizados, são identificados como representantes do subgênero *Leishmania*^{10,35,36}.

Em nosso laboratório, após examinar mais de 350 diferentes mamíferos silvestres, de diferentes regiões endêmicas do Estado de São Paulo, foram isoladas, apenas, duas cepas de *Leishmania*, uma das quais em um roedor (*Akodon* sp)³⁵ capturado no município de Iguape, no Vale do Ribeira e, mais recentemente de *Proechimys iheringi* capturado no município de Ithabela na região do Litoral Norte paulista. Estes isolados pertencem ao subgênero *Leishmania*, não se tratando, portanto, de *L. (V.) braziliensis* (dados não publicados).

Por outro lado, desde o pioneiro trabalho de PEDROSO em 1913²⁸, a LTA vem sendo reconhecida, diagnosticada e identificada a presença de *L. (V.) braziliensis* em cães e, secundariamente em eqüinos em áreas endêmicas caracterizadas por uma paisagem natural bastante alterada em relação a uma primitiva cobertura vegetal, situação esta típica de áreas de colonização antiga no Brasil onde este agente parasitário é o predominate nos casos humanos da parasitose^{6,9,11,12,21,29,33}.

Em relação ao presente estudo, ressaltamos a opção por considerar todos os valores de reatividade destacando mesmo aqueles entre 3-4 mm e não apenas os maiores ou iguais a 5 mm ao TIDR, por entendermos a necessidade de revisão dos parâmetros e condições para a definição e valorização dos resultados obtidos em provas de avaliação de respostas de hipersensibilidade tipo tardia em estudos epidemiológicos, principalmente com hospedeiros não humanos de *L. (V.) braziliensis* ou mesmo, com valores de reatividade na RIFI abaixo de 1:40.

Os resultados obtidos nestes inquéritos indicam que em Itupeva, de um total de 56 cães inquiridos, 10 (17,9%) foram reativos para, pelo menos, um dos testes utilizados, se considerado qualquer nível de reatividade.

Considerada apenas a reação ao TIDR, foram 7 (12,5%) os cães com respostas ao antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis*, com variação de 3 até 13 mm de enduração.

Em que pese todas as ressalvas quanto a valorização da reação de imunofluorescência indireta como técnica laboratorial para investigação prospectiva da presença de infecção por *Leishmania* na população canina estudada e, se considerarmos apenas como "positivos" os animais com TIDR \geq 5 mm e/ou RIFI \geq 1:20, ainda assim teríamos 7,1%. Essa taxa de 7,1% deve suscitar e, alimentar as especulações sobre possibilidade desses animais domésticos exercerem algum papel na manutenção de focos de transmissão natural uma vez que, estando permanentemente expostos nesse ambiente endêmico em contato com as populações de flebotomíneos que, por sua vez, podem e, também, devem estar mantendo relacionamento com a população humana, potencializando, talvez, o risco de transmissão da LTA ao homem.

Durante muito tempo, acreditava-se que cães e outros animais domésticos devessem ser considerados, a exemplo do homem, vítimas ou hospedeiros acidentais desses parasitas^{18,20,25}, exceção apenas, no caso da "uta" dos Vales Andinos peruanos onde HERRER¹⁶ encontrou grande número de cães naturalmente infectados. Mais recentemente, em várias localidades brasileiras, altas taxas de infecção, até maiores que as peruanas, vem sendo registradas: 10,5% na Ilha Grande, no Estado do Rio de Janeiro⁴ e 16,9% em Viana, no Espírito Santo (informação pessoal de FALQUETO, 1983 citada em AGUILAR et al²). Ressalta-se ainda, os 7% verificados em Las Rosas, Estado de Cojedes na Venezuela².

Nossos resultados, dependendo dos níveis de reatividade considerados para a TIDR ou para a RIFI, apontam para taxas entre 7,1% e 17,9% de "positividade", para cães inquiridos do Bairro Guacuri, no município de Itupeva, região do planalto em São Paulo. A aparente discordância de resultados, com casos de reatividade ao TIDR e não reagentes à RIFI e vice-versa já foi apontada por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS²², na única experiência anterior de utilização de antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis* — P 10000 em inquérito canino.

Os resultados obtidos no inquérito canino realizado em Eldorado na região do Vale do Ribeira, próximo ao nível do mar, revelaram uma situação bastante diferente, uma vez que apenas 2 entre 77 cães (2,6%) foram reativos ao TIDR, ainda assim com valores de 3 e 4 mm e, 1 (1,3%) cão não reativo ao TIDR apresentou RIFI de 1:20.

Se considerarmos que nenhum animal daqueles inquiridos neste estudo, apresentou qualquer lesão ulcerada, sugestiva de LTA, achamos lícito continuar nesta linha de investigação pois, talvez estejam indicando que o parasitismo nesses animais, por *L. (V.) braziliensis*, se dê com uma distribuição dos parasitas mesmo no tegu-

mento aparentemente são, o que vem sendo objeto de estudos ora em andamento.

Acreditamos que se animais domésticos possam ter algum papel na manutenção de *L. (V.) braziliensis* em ambientes endêmicos de regiões de colonização antiga, "a priori", deveremos entendê-los como amplificadores potenciais da disseminação do parasita e não como verdadeiros reservatórios naturais. Mesmo assim, esse padrão, se confirmado, não necessariamente poderá ser generalizado, pois em algumas regiões a impossibilidade de demonstração de taxas significativas de infecção em cães¹⁵ deixa, ainda, a impressão da existência de um verdadeiro reservatório silvestre, "mantenedor perene" de *L. (V.) braziliensis* na natureza, o que misteriosamente

permanece por ser demonstrado.

Acreditamos, finalmente, que na hipótese de confirmação de que cães ou outros animais domésticos possam exercer o papel de fonte de *Leishmania (V.) braziliensis* para infecção de flebotômíneos ao nível do peridomicílio humano, a utilização de procedimentos diagnósticos simples, de baixo custo e de fácil execução em campo, tal como o TIDR desenvolvido por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS²² e, por nós utilizado neste estudo, venha possibilitar condições para o monitoramento da circulação deste parasita em regiões onde animais domésticos possam ser suspeitos de participação na manutenção do protozoário na natureza.

RIALA 07/840

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BISUGO, M.C.; CUNHA, E.A.; ELIAS, C.R. & LAROSA, R. — Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. II. Use of particulated antigen of *Leishmania (V.) braziliensis* in canine inquires in different endemic areas. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 65-71, 1998.

ABSTRACT: Many researchers have questioned about the involvement of domestic animals as sources of infection to man in endemic areas of ACL in the Southeast and South region of Brazil. In the State of Espírito Santo, the role of dogs as "reservoirs" of *L. (V.) braziliensis* in the ancient zone covering atlantic forest was confirmed finding high rates of infection among dogs. For the State of São Paulo, we have the same concern in relation to the vertebrate source of infection, probably represented by dogs. In this study we carried out two inquiries in order to investigate the *Leishmania* infection in canine population: in Itupeva (Jundiá region) and Eldorado (Ribeira River Valley region) cities, which are all endemic areas. For the first time it was employed, the skin test (ST) with particulated antigen of *Leishmania (V.) braziliensis* was Employed and, indirected immunofluorescence test (IIT) with antigens of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi*, and *L.(L.) amazonensis* used in parallel. In Itupeva, from 56 inquired dogs, 10 (17,9%) were reactive for at least one of the two tests, when accepted any value of reactivity. In Eldorado, only 6 out 77 (7,8%) dogs revealed some reactivity. These results indicate to be promising and very practical the use of ST under field conditions for trial the natural infection of *L. (V.) braziliensis* in animals suspected with any importance as source of infection. By these studies it seems to be minor the participation of dogs in maintenance of parasite in the nature in Eldorado, but the data observed in Itupeva strengthen the necessity of better knowledge about involvement of dogs in the *Leishmania* circulation. Probably dogs play role in different degrees of relationship with *Leishmania* in different regions. We believe that such results would be fundamental for definition of control strategies.

Descriptors: American Cutaneous Leishmaniasis; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; natural reservoir; source of infection; particulated antigen; skin test; canine inquiries.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, G.M., VILELA, M.L. & LIMA, R.B.- Ecology of the sandflies of Itaguai, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **82**: 583-584, 1987.
2. AGUILAR, C.M.; FERNANDEZ, R. & DEANE, L.M. — Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **79**: 181-195, 1984.
3. AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GARCIA, L.; FERNANDES, E.; MOMEM, H.; GRIMALDI Jr., G. & VARGAS, Z. — Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela e Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **84**: 19-28, 1989.

4. ARAÚJO F^o, N.A. — *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores*. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978, 148p.
5. BARBOSA-SANTOS, E.G.O., MARZOCHI, M.C.A.; SILVA, V.L.; CONCEIÇÃO, N.F.; SILVA, P.C.T. & SANTOS, C. — Elicitation of the delayed hypersensitivity reaction in canine mucocutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **81** (suppl.): 146, 1986.
6. BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; VEXENAT, J.A.; ROSA, A.C.; MARSDEN, P.D. & MAGALHÃES, A.V. — Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia, Brasil. II — Leishmaniose canina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **17**: 59-65, 1984.
7. BONFANTE-GARRIDO, R.; MURILO, N. & TORRES, R. — Leishmaniasis cutanea canina en Venezuela. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, **91**: 160-165, 1981.
8. BRUMPT, E. & PEDROSO, A. — Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo (Brasil). *Ann. Paul. Med. Cir.*, **1**: 97-136, 1913.
9. DIAS, M.; MAYRINK, L.M.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; BATISTA, S.M.; ARAÚJO, F.G., COELHO, M.V. & WILLIAMS, P. — Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I. Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop.*, S. Paulo, **19**: 403-410, 1977.
10. FALQUETO, A.; GRIMALDI Jr.; G.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M. & DEANE, L.M. — *Lutzomyia gasparviannai*, Martins, Godoy & Silva, 1962, probable vector of *Leishmania mexicana* ssp. in Viana municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **80**: 497, 1985.
11. FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI F^o, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.; JESUS, A.C. & ALENCAR, J.J. — Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **85**: 155-163, 1986.
12. FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M. & SESSA, P.A. — Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the State of Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **82**: 443, 1987.
13. FALQUETO, A. — *Especificidade alimentar de flebotômíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo*. Tese. Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, 1995, 84p.
14. FORATTINI, O.P. & OLIVEIRA, O. — Focus of cutaneous leishmaniasis in an area South of State of São Paulo, Brazil. *Arch. Fac. Hig. Saúde Públ.*, São Paulo, **11**: 23-34, 1957.
15. GOMES, A.C.; COUTINHO, S.G.; PAIM, G.V.; OLIVEIRA, S.M.O.; GALATI, E.A.B.; NUNES, M.P.; CAPINZAKI, A.W.; YAMAMOTO, Y.I. & ROTTER, R. — Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1980-1989. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, **32**: 105-115, 1990.
16. HERRER, A. — Estudio sobre la leishmaniose tegumentaria en el Peru. V. Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utógenas. *Rev. Med. Exp. (Lima)*, **8**: 87-105, 1949/1951.
17. HERTIG, M.; FAIRCHILD, G.B. & JOHNSON, C.M. — Leishmaniasis transmission — reservoir project. *Ann. Rep. Gorgus Memorial Laboratory*, 1956: 9-11, 1957.
18. LAINSON, R. — The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**: 569-596, 1983.
19. LAINSON, R. — On *Leishmania enrietti* and others enigmatic leishmania species of the Neotropics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **92**: 377-387, 1997.
20. LAINSON, R. & SHAW, J.J. — Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* Vol.1. Ed. PETERS, W. & KILLICK-KENDRICKS, R. — Academic Press Inc., London, 1987.
21. MARZOCHI, M.C.A. — Leishmanioses no Brasil. As Leishmanioses Tegumentares. *JBM*, **63**: 82-104, 1992.
22. MARZOCHI, M.C.A. & BARBOSA-SANTOS, E.G.O. — Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **83**: 391-392, 1988.
23. MARZOCHI, M.C.A. & BARBOSA-SANTOS, E.G.O. — Processo de preparação de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Prop. Industr.*, **1021**: 29, 1990.
24. MARZOCHI, M.C.A.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; URTADO, W.; QUEIROZ, F.J.; CHICARINO, J.M.C.; SILVA, R.T. & SILVA, A.F. — Forma cutânea e disseminada da infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em uma égua

- Equus caballus*. II. Aspectos clínicos, imunopatológicos e terapêuticos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24 (supl. II): 99, 1991.
25. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, A.N.; MARTINS, A.V.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, C.A., FALCÃO, A.R.; MELO, M.N. & FALCÃO, A.L. — Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 73: 123-137, 1979.
 26. MELLO, D.A. — Parasitic disease in Brazil and the role of wild mammals: an analysis based on leishmaniasis, Chagas' disease and schistosomiasis mansoni. *Ci. e Cult.*, 43:274-278, 1991.
 27. OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.F.; SCHUBACH, A. & GRIMALDI Jr., G. — An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 83: 427-435, 1988.
 28. PEDROSO, A.M. — Leishmaniose local de cão. *An. paul. Med. Cirurg.* 1: 33-40, 1913.
 29. PEREIRA, C.F.M. & FONSECA, H.H.R. — Leishmaniose Tegumentar Americana: epidemiologia e controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27 (Supl. III):45-50, 1994.
 30. PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G., MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P. & GRIMALDI Jr., G. — Canine american cutaneous leishmaniasis, a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania* of Rio de Janeiro, Brazil. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 38: 52-58, 1988.
 31. PONS, A.R. & LONDRES, H. — Leishmaniasis tegumentaria americana en el Asentamiento campesino de Zipayare. Aspectos epidemiológicos, clínicos e inmunológicos. Su importancia en la reforma agraria. *Kasmera*, 3: 5-59, 1968.
 32. SILVEIRA, R.C. — Distribuição e frequência da Leishmaniose em São Paulo. Thesis. Fac. Med. Cir. S. Paulo, 1919. 72 p.
 33. TOLEZANO, J. E. — Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 89:427-433, 1994.
 34. TOLEZANO, J.E.; MACORIS, S.A.G. & DINIZ, J.M.P. — Modificação na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:49-54, 1980.
 35. TOLEZANO, J.E.; ARAÚJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; VALENTIM, A.M. & BARCA, M.L. — *Leishmania* sp isolated from blood heart of *Akodon* sp (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape city, São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 83:88, 1988.
 36. YOSHIDA, E.L.A.; CUBA, C.A.C.; PACHECO, R.S.; CUPOLILO, E.; TAVARES, C.C.; MACHADO, G.M.C.; MOMEM, H. & GRIMALDI, G. — Description of *Leishmania (Leishmania) forattinii* sp.n., a new parasite infecting opossum and rodents in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 88: 397-406, 1993.

Recebido para publicação em 03/04/98

FUMONISINAS: ASPECTOS ANALÍTICOS

Miguel MACHINSKI JUNIOR

M. MACHINSKI J. – Fumonisinas: Aspectos Analíticos – Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Laboratório de Toxicologia. Av. Colombo, 5790. CEP 87020-900. Maringá – Pr. Fone (044) 262-4350. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 73-88, 1998.

RIALA 07/842

RESUMO: As fumonisinas, micotoxinas presentes em alimentos e rações, principalmente no milho, são produzidas por fungos do gênero *Fusarium*. Foi demonstrado experimentalmente que a fumonisina B¹ causa a leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar em suínos (EPS) e câncer hepático em ratos, além de ser provável agente responsável pelo câncer de esôfago em humanos, como demonstram os estudos epidemiológicos realizados na África do Sul e na China. Com a finalidade de fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de fumonisinas em alimentos e rações, foi realizada uma revisão da metodologia analítica relatados na literatura científica.

DESCRITORES: Fumonisinas, métodos analíticos, alimentos, rações.

INTRODUÇÃO

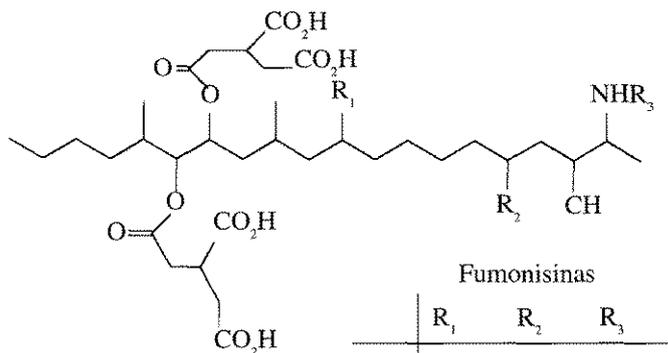
A micotoxina fumonisina B¹ (FB¹) foi isolada e purificada por GELDERBLUM et alii¹⁵ em 1988 em culturas de *Fusarium moniliforme* e caracterizada estruturalmente por BEZUIDENHOUT et alii¹⁹ (Figura 1). A FB¹ tem sido a principal causa do câncer hepático em ratos¹⁶, leucoencefalomalácia (LEME) em equinos³⁵, edema pulmonar em suínos¹³. Leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI et alii, 1996), está associada com câncer de esôfago em humanos⁶². Os efeitos tóxicos sugerem a necessidade de controlar a presença de fumonisinas em alimentos e rações.

O conhecimento dos níveis de fumonisinas em produtos naturalmente contaminados por estas micotoxinas só pode ser observado através de métodos analíticos adequados. Tais métodos são necessários para a fiscalização, monitoramento e pesquisa nos seus vários aspectos, seja análise de alimentos e rações, estudo epidemiológicos, estudo da produção de fumonisinas e do metabolismo dos fungos, verificação da estabilidade durante o processamento de alimentos e condições para descontaminação⁴⁰.

As etapas envolvidas no procedimento analítico para a detecção de fumonisinas são: extração, purificação, detecção, quantificação e confirmação (Tabela 1).

Esta revisão resume as informações sobre a metodologia analítica para a determinação de fumonisinas.

Figura 1 – Estrutura química das fumonisinas.



Fumonisinas			
	R ₁	R ₂	R ₃
FA1	OH	OH	CH ₂ CO
FA2	H	OH	CH ₂ CO
FB1	OH	OH	H
FB2	H	OH	H
FB3	OH	H	H
FB4	H	H	H

EXTRAÇÃO

As fumonisinas são compostos fortemente polares, solúveis em água, bastante solúveis em acetonitrila-água e muito solúveis em metanol, mas não são solúveis em solventes não polares³⁹.

TABELA 1
Etapas envolvidas no procedimento analítico de fumonisinias.

Etapas	Descrição
1. Extração	solventes agitação filtração e/ou centrifugação fluido supercrítico
2. Purificação	cromatografia de troca iônica cromatografia de fase reversa cromatografia de imunoafinidade
3. Detecção/Quantificação	cromatografia em camada delgada cromatografia em camada delgada de alta eficiência cromatografia líquida de alta eficiência - detector por absorvância no ultra-violeta - detector de fluorescência - detector de massas cromatografia gasosa - detector de ionização de chama - detector de massas eletroforese capilar imunoensaíais - ELISA - fibra óptica
4. Confirmação	derivação química espectrometria de massas imunoensaíais

A extração de fumonisinias de amostras, sejam milho, rações, arroz, leite, meios de cultura ou outras, requer o uso de solventes ou mistura destes (Tabela 1). A combinação de metanol-água (3:1) é a mais utilizada. Outras proporções também empregadas são: 3:2, 1:1, 1:3 e 4:1 (Tabela 2). A mistura acetonitrila-água (1:1) tem apresentado boa recuperação de fumonisinias presentes em amostras naturalmente contaminadas^{08, 34, 36}. RICE et alii³⁴ observaram que acetonitrila-água (1:1) fornece uma melhor recuperação para as fumonisinias B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) em um curto tempo de agitação (30 minutos) e que extratos lípidos são obtidos com o uso de acetonitrila e metanol, enquanto são necessários métodos de clarificação (por exemplo, a centrifugação) quando a água é usada como solvente extrator.

A etapa de extração de fumonisinias requer um adequado estudo, devendo-se observar os fatores que podem alterar a recuperação do método. ALBERTS et alii⁰⁴ e SCOTT & LAWRENCE⁴⁴ observaram o efeito do pH durante a extração de fumonisinias em meios de cultura,

milho e seus derivados. ALBERTS et alii⁰⁴ demonstraram uma recuperação 17% maior de FB₁ em uma extração com pH 3,5 usando metanol-água (3:1) do que em pH 6. Esta última, 30% maior do que em pH 8 e 19% maior do que em pH 2. Enquanto, SCOTT & LAWRENCE⁴⁴ observaram que o uso de tampão borato pH 9,2 melhorou a recuperação de FB₁ e FB₂ em farelo de milho. Portanto, verifica-se que a natureza da matriz é outro fator importante.

Para a extração de fumonisinias em milho são necessários longos períodos de agitação (15 a 60 minutos) ou o uso de potentes agitadores, como o *Polytron mixer* (2 a 5 minutos)³⁴. A filtração e a centrifugação auxiliam a próxima etapa que é a purificação da amostra.

SELIM et alii⁴⁶ desenvolveram e otimizaram um método de extração para fumonisina B₁ em milho utilizando fluido supercrítico. O método é rápido, eficiente e preciso, além de reduzir o uso e a exposição a solventes orgânicos. O uso de 15 mL de CO₂ líquido, ácido acético como modificador em uma concentração de 5 % e em um volume de 750 µL

TABELA 2

Levantamento de métodos para extração de fumonisinias em diversos substratos.

Substratos analisados	Fumonisinias	Solventes	Tempo de agitação (min)	Filtração (Whatman nº)	Centrifugação	Referências
Milho e seus produtos derivados	FB1, FB2	metanol-água (3:1)	5-30	4	500 g/10' - 4°C	03, 33, 34, 49, 51, 53, 66, 67
			2-3	1		
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)				43, 54, 55
	FBI	metanol-água (3:1)	3-30	2		57, 71
	FBI	metanol-água (4:1)	60	4		64
	HFBI		3	4		42
	FBI, FB2	metanol-tampão borato pH 9,2 (3:1)	5	4		44
	FBI, FB2	metanol-água HCl 5N (3:1:0,3)	5	4		44
	FB1, FB2	NaCl/metanol-água (4:1)	2	4		65, 72
	FB1, FB2	metanol-HCl 0,1M (3:1)	5		4000g/10' -4°C	23
	HFBI	metanol-acetonitrila-água (1:1:2)		4		42
	FB1, FB2, FB3, HFBI	acetoneitrila-água (1:1)	30-60	4	15000 rpm/15'	08, 20, 31, 33, 34, 37, 48
	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		34
Rações a base de milho	FB1, FB2	acetato de etila / metanol-água (3:1)	30	4		32
	FBI	acetoneitrila-água (1:1)	20-60	4		19, 36
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	2-30	4	500 g/10' - 4°C	54
Leite	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		34
	FB1, FB2	metanol-acetona (1:1)	10		10000 rpm/10' -20°C	26
	FB1, FB2	acetoneitrila-água (1:1)	10		10000 rpm/10' -20°C	26
Arroz	FB1	metanol-água (3:1)	3	4		14
Cultura de fungos	FB1, FB2	acetato de etila/metanol-água (3:1)	30-60	4		09, 10, 15
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	5	4	500 g/10' - 4°C	04, 05, 34, 53
	FB1	metanol-água (3:2)	30-60	4		68
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (1:3) e (1:1)	30-60	4		04

TABELA 2

Levantamento de métodos para extração de fumonisinas em diversos substratos.

Substratos analisados	Fumonisinias	Solventes	Tempo de agitação (min)	Filtração (Whatman nº)	Centrifugação	Referências
	FB1, FB2	clorofórmio-metanol (1:1)	2	4		70
	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		04
	FB1, FB2, FB3	metanol	30-60	4		04
	FB1, FB2	acetoneitrila-água (1:1)			2000 rpm/5'	04
Plasma e urina	FB1	metanol				50

Obs.: HFB1 - hidrolizado de fumonisina B1.

por grama de amostra, 1200 *psi* de pressão e vinte minutos de extração estática foram as condições ótimas para a extração da fumonisina B₁ em milho contaminado.

PURIFICAÇÃO

A etapa de purificação na análise de fumonisinas é necessária para remover os compostos interferentes que

são co-extraídos com os solventes. Os procedimentos de limpeza do extrato envolvem a partição líquido-líquido, colunas de extração com fase sólida e mais recentemente o uso de colunas de imunoafinidade³⁹ (Tabela 3).

Segundo WARE et alii⁷¹, o procedimento de purificação utilizando coluna de fase reversa C₁₈ é rápido, eficiente e preciso. Os interferentes polares são removidos da amostra pela lavagem com metanol-água (1:3), (1:1) ou KCl 1%-acetoneitrila (9:1). De acordo com ALBERTS

TABELA 3

Principais técnicas de purificação dos extratos obtidos nas análises de fumonisinas.

Técnicas de purificação	Descrição	Referências
Colunas de Extração de - Fase reversa C ₁₈	Fase Sólida	
	metanol-água (1:1) → metanol-água (3:1)	10, 15
	metanol-água (1:3) → metanol-água (3:1)	04, 05, 53
	água acetoneitrila-água (2:8) acetoneitrila-água (7:3)	20, 36
	KCl 1% acetoneitrila-KCl 1% (1:9) acetoneitrila-água (7:3)	18, 19, 33, 34, 37, 48, 73
	metanol-água (1:3) → acetona-acetato de etila (1:1) → clorofórmio-metanol-ácido acético (60:40:10)	08, 71
- Troca aniônica forte (TAF)	metanol-água (3:1) → metanol → metanol-ácido acético (0,5 a 5%)	14, 19, 23, 26, 43, 44, 49, 50, 51, 54, 58, 61, 63, 67
- Combinações	fase reversa C ₁₈ troca aniônica forte (SAX)	19, 42
Colunas de Imunoafinidade	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → Na ₂ B ₄ O ₇ 0,05M em água-metanol (1:4)	72
	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → metanol-água (4:1)	65
	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → metanol	41

et alii⁶⁴ a perda de fumonisinias, principalmente a FB₁, é grande quando usa-se metanol-água (1:1) ao invés de metanol-água (1:3). Segundo WARE et alii⁷¹ para a remoção de interferentes não polares usa-se o acetato de etila-acetona (1:1) e a FB₁ é eficientemente eluída da coluna quando utiliza-se clorofórmio-metanol-ácido acético (60:40:10). A eluição das fumonisinias de colunas C₁₈ é geralmente realizada com metanol-água (3:1)^{64, 65, 10, 15, 53} ou acetonitrila-água (7:3)^{18, 19, 20, 33, 34, 36, 37, 48}. Quando empregaram-se acetonitrila-água (7:3) para a eluição das fumonisinias, WILSON et alii⁷³ preconizaram lavar a coluna com acetonitrila-KCl 1% (1:9) para remover os interferentes de matriz e permitir que as fumonisinias sejam fossem quantitativamente eluídas. RICE et alii³⁴ mostraram que o fator crítico na purificação com C₁₈ é a própria coluna, pois há diferença na recuperação das fumonisinias entre marcas diferentes e até mesmo em diferenças de lotes de fabricação da mesma marca.

A coluna de troca aniônica forte (TAF) foi primeiramente utilizada por SHEPHARD et alii⁴⁹ na análise de fumonisinias e é a mais citada na literatura^{03, 14, 19, 23, 26, 43, 44, 50, 51, 54, 58, 61, 67}. Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que os solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos por deslocamento com outros íons com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Apesar deste princípio ser simples, o mecanismo de separação de troca iônica pode ser complexo. Vários fatores como pH, força iônica e fluxo de eluição podem afetar a retenção ou eluição das fumonisinias^{14, 54, 63}. Baixas recuperações podem ser obtidas se o fluxo de eluição for maior que 1 mL/min ou o pH do extrato for menor que 5,8^{54,63}. DAWLATANA et alii¹⁴ obtiveram uma melhor recuperação em pH 6,2 para extratos de arroz. SYDENHAM et alii⁵⁴ indicaram que o uso de solvente com maior força iônica (metanol-ácido acético 1%) reduz o volume de eluato sem co-eluir compostos intrínsecos do milho que interferem com a determinação cromatográfica de fumonisinias. As colunas TAF podem ser regeneradas e reutilizadas para purificação de fumonisinias sem perda na recuperação do analito⁵⁴.

BENNETT & RICHARD⁰⁸ recomendaram o uso de colunas C₁₈ ou TAF para a etapa de purificação de fumonisinias. Entretanto, deve-se testar a recuperação devido a grande variações observadas em diferentes lotes de colunas C₁₈. Observaram também que as colunas TAF são mais eficientes na eliminação de compostos interferentes dos extratos e os extratos são mais límpidos, mas deve-se eluir as fumonisinias lentamente (<1 mL/min) e o pH do extrato deve estar entre 6 e 7.

A limpeza com ambas colunas C₁₈ e TAF foi realizada por HOLCOMB et alii¹⁹ para diminuir os altos picos da linha de base. A presença destes picos aumenta o ruído e diminui a sensibilidade do método.

A cromatografia de imunoafinidade mostra-se apropriada para a etapa de purificação de fumonisinias em amostras 17. WARE et alii⁷² avaliaram a capacidade, seletividade, reprodutibilidade deste tipo de colunas e concluíram que estas colunas são excelentes para a etapa de purificação de fumonisinias em milho e outros seus derivados. As variações coluna-coluna e entre cada lote não foram significativamente diferentes. A curva é linear de 0,1 a 1,0 µg para FB₁ e FB₂. A curva indicou saturação dos sítios de ligação da coluna acima de 1,0 µg de FB₁ e FB₂. Interferentes de matriz têm pouca influência na eficiência da ligação da FB₁ e FB₂ na coluna. Estas fumonisinias possuem afinidade semelhante pela coluna, portanto, o anticorpo não distingue as duas moléculas. TRUCKSESS et alii⁶⁵ observaram que o metanol afeta a ligação antígeno-anticorpo e indicaram o uso de metanol-água (4:1) ao invés do metanol para a eluição da FB₁ em colunas de imunoafinidade.

SYDENHAM et alii⁵⁶ recomendam, quando possível, o uso de material de referência certificado para avaliar a qualidade de cada grupo ou lote de adsorvente.

A etapa final na preparação de amostra para análise de fumonisinias é a redução do volume por evaporação do solvente em rotaevaporador sob pressão reduzida ou banho aquecido sob fluxo de nitrogênio. A amostra seca será redissolvida em um volume conhecido de solvente ou sofrerá reação de derivação para ser usada na etapa de detecção/quantificação.

DETECÇÃO/QUANTIFICAÇÃO

A determinação de fumonisinias em amostras de alimentos e cultura de fungos tem sido realizada principalmente através de técnicas cromatográficas (Tabela 1).

Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência

A análise de fumonisinias por cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) pode ser realizada em fase normal^{01, 10, 14, 21, 32, 36, 53, 70} ou fase reversa^{01, 15, 37, 48, 68} (Tabela 4).

O método desenvolvido por GELDERBLUM et alii¹⁵ para a detecção de fumonisinias utiliza metanol-água (3:1) como sistema-solvente, placas de fase reversa e p-anisal-deído como agente cromogênico, mas possui um baixo limite de detecção (10 µg/g)³⁶. ROTTINGHAUS et alii³⁷ utilizaram o cloreto de potássio na fase móvel e a fluores-

TABELA 4

Valores de Rf das fumonisinas para diferentes sistemas-solventes e agentes cromogênicos ou de intensificação de fluorescência usados em CCD/CCDAE de fase normal ou reversa.

Sistema-solvente	Rf	Fase estacionária	Reveladores	Referências
metanol-água (3:1)	FB ₁ - 0,44 a 0,55 FB ₂ - 0,22	reversa C ₁₈	p-anisaldeído 0,5% (púrpura)	15, 68
metanol-água (80:20)	FB ₁ - 0,61 FB ₂ - 0,47	reversa C ₁₈	p-anisaldeído 0,5%	01
metanol-KCl 4% (3:2)	FB ₁ - 0,50 FB ₂ - 0,10	reversa C ₁₈	fluorescamina (fluorescência amarelo - esverdeada)	37, 48
clorofórmio- metanol-ácido acético (6:3:1)	FB ₁ - 0,15 a 0,30 FB ₂ - 0,20 a 0,30 FB ₃ - 0,26 FB ₄ - 0,31	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5% ou ninhydrina 0,2%	10, 21, 32 36, 53, 70 10
clorofórmio- metanol-ácido acético (7:2:1)	FB ₁ - 0,20	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,17%	14
clorofórmio-metanol- ácido acético (60:35:10)	FB ₁ - 0,32 FB ₂ - 0,52	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5%	01
clorofórmio-metanol- água-ácido acético (55:36:8:1)	FB ₁ - 0,23 FB ₂ - 0,30 FB ₃ - 0,30 FB ₄ - 0,37	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5% ou ninhydrina 0,2%	10

camina como agente intensificador de fluorescência para aumentar a sensibilidade (0,1 µg/g) e a especificidade.

JACKSON & BENNETT²¹ utilizaram a CCDAE para resolver a separação das fumonisinas devido à dificuldade em separar as FB₁, FB₂ e FB₃. WILSON et alii⁷³ citam que deve-se remover a água do extrato (acetonitrila-água, 1:1) antes do desenvolvimento cromatográfico em fase normal, o que não é necessário quando usa-se a cromatografia em fase reversa.

Outros métodos, além da CCD, têm sido desenvolvidos, permitindo uma melhor exatidão na quantificação do teor de fumonisinas em amostras, mas a CCD continua sendo uma importante técnica de confirmação^{30, 37}.

fluoroacetato das moléculas dos aminopolióis (aminopentol e aminotetraol originados das FB₁ e FB₂, respectivamente)^{09, 21, 32, 58, 68, 70}. Os derivados são bem separados por CG capilar (coluna DB-5, filme de 0,25 µm, 30 a 60 m de comprimento) e detectados por ionização de chama ou espectrometria de massas.

Os procedimentos acima possuem a vantagem de facilitar a combinação da CG com a espectrometria de massas, cuja finalidade é a confirmação do resultado⁶². A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas possui seletividade e especificidade, mas perde em sensibilidade e requer equipamentos sofisticados e de custo elevado⁶², além de não ser prática para análise de grande número de amostras⁵⁴.

CROMATOGRAFIA GASOSA

Os procedimentos de cromatografia gasosa (CG) capilar na determinação de amostras contaminadas por fumonisinas são precedidos pela hidrólise alcalina^{09, 21, 32, 58, 68, 70} ou ácida⁵³ de seus extratos, seguidos pela esterificação com isobutanol e anidrido heptafluorobutírico do ácido tricarbálico⁵³ e/ou acilação com trimetilsilil ou tri-

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Como as fumonisinas são solúveis em água, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) predomina entre as demais técnicas utilizadas para a detecção e quantificação destas micotoxinas. O uso de colunas de

TABELA 5

Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de fumonisinias.

Detecção	Fase móvel	Limite de detecção (µg/g)	Referências
Ultra-violeta			
anidrido maléico (230 a 250 nm)	metanol-tampão fosfato 0,05 a 0,1M pH 3,3 a 3,8 (70:30)	FB ₁ - 10 a 40 FB ₂ - 80 a 100	04, 05, 10, 15, 53
Fluorescência			
fluorescamina λ exc - 390 nm λ em - 475 nm	acetonitrila-tampão acetato 0,1M pH 3,3 (1:1) acetonitrila-KCl 1%-ácido acético (40:59:1) Gradiente: A 100%, 0,1 min → A e B 50%, 6 min → B 100%, 4 min. A = acetonitrila-água-ácido acético (40:59:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (60:39:1)	FB ₁ - 0,05 a 1 FB ₂ - 1 a 5	18, 53 37 36
o-ftaldialdeído (OPA) λ exc - 335 nm λ em - 440 nm	metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (80:20) metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (68:32) metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (66:34) acetonitrila-água-ácido acético (50:50:1) acetonitrila-tampão fosfato 0,05M pH 3,3 (40:60) metanol-água-ácido acético (77:23:1) Gradiente: 1) metanol-fosfato (55:45) → ace- tonitrila-água (8:2), 10 min 2) A B, 9 min C, 17 min A = acetonitrila-água-ácido acético (40:59:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (60:39:1) C = acetonitrila	FB ₁ - 0,05 FB ₂ - 0,10 FB ₁ e FB ₂ - 0,01 FB ₁ - 0,025 FB ₂ - 0,05 FB ₁ - 0,02	27, 36, 49 54 50, 60 51, 65 20, 33, 34 12 41, 42 61
naftaleno-2,3- dicarboxaldeído (NDA) λ exc - 410-420 nm λ em - 440-500 nm	acetonitrila-água-ácido acético (55:45:1) acetonitrila-água-ácido acético (60:40:1) Gradiente: 1) acetonitrila-água-ácido acético (55:45:1), 10 min → acetonitri-la-água (8:2), 7 min 2) A 60% e B 40%, 8 min → A 80% e B 20%, 16 min A = acetonitrila-água (99:1) B = água-ácido acético (99:1) 3) A 70% e B 30%, 2,6 min A 55% e B 45%, 10,1 min B 100%, 14,1 min A = metanol-água-ácido acético (75:24:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (75:24:1)	FB ₁ - 0,01	71 08, 72 41, 43, 44 08 26
4-fluor-7-nitro-benzeno -2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) λ exc - 460 nm λ em - 500 nm	Gradiente: A 100%, 5 min → A e B 50%, 15 min → B 100%, 10 min A = metanol-tampão fosfato pH 5 (1:1) B = acetonitrila-água (8:2)	FB ₁ - 0,02 FB ₂ - 0,02 HFB ₁ - 0,01	41, 42, 43, 44
6-aminoquinolil-N- hidrosuccini-midil carbamato (AccQ-Fluor) λ exc - 395 nm λ em - 418 nm	Gradiente: A e B 50%, 11 min B 65% e A 35%, 2 min A = tampão fosfato 0,1 M pH 7 B = metanol	FB ₁ - 0,26	67

TABELA 5 (continuação)

Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de fumonisinias.

Detecção	Fase móvel	Limite de detecção (µg/g)	Referências
9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) λ exc - 263 nm λ em - 313 nm	Gradiente: B 40% e A 60%, 9 min B 70% e A 30%, 8 min B 100%, 1 min A = acetonitrila-tampão citrato (30:70) B = acetonitrila-tampão citrato (70:30)	FB ₁ - 0,2	19
isotiocianato de fluoresceína (FITC) λ exc - 488 nm λ em - 520 nm	Gradiente: A 30% e B 70% → A 42% e B 38%, 7,2 min → A 90% e B 10%, 12 min → A 30%, 4 min A = metanol B = tampão fosfato 0,01 M pH 7,5	FB ₁ - 0,02	24
4-(N,N-dimetila- minosulfonil)-7- fluoro-2,1,3- benzoxadiazol (DBD-F) λ exc - 450 nm λ em - 590 nm	Gradiente: A 100% → B 15%, 5 min → B 90%, 13 min A = tampão fosfato 0,05 M-metanol (1:1) B = acetonitrila-água (75:25)	FB ₂ - 0,01 FB ₁ - 0,01	02, 03
Espectrometria de massa	Gradiente: B 40% e A 60% → B 100%, 7 min A = 0,05% de ácido trifluoroacético B = 0,05% de ácido trifluoroacético em metanol	FB ₁ - 0,0008	23

fase reversa (C₈ ou C₁₈) com diferentes fases móveis é amplamente citado na literatura científica^{04, 05, 08, 10, 12, 15, 18, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 32, 34, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 49, 50, 51, 53, 54, 60, 61, 65, 67, 71, 72}.

As fumonisinias têm sido separadas por eluição isocrática ou gradiente. Na eluição isocrática utiliza-se a mistura metanol-tampão fosfato 0,05 a 0,1 M pH 3,3 a 3,8 em diferentes proporções 80:20^{27, 36, 49}, 70:30^{05, 10, 15, 53}, 68:32⁵⁴ e 66:34^{50, 60}, ou as combinações acetonitrila-água-ácido acético na proporção 50:50:1^{51, 65}, 55:45:1⁷¹ e 60:40:1^{08, 72} e acetonitrila-tampão fosfato 0,05 M pH 3,3 (60:40)^{20, 33, 34}. Na eluição por gradiente emprega-se a mistura de dois ou mais solventes, como metanol e tampão fosfato ou acetonitrila, água e ácido acético^{08, 19, 23, 24, 26, 36, 41, 42, 43, 44, 61, 67}.

As fumonisinias não absorvem radiação ultravioleta (UV) e não fluorescem, portanto é necessário sofrerem uma modificação química para serem observadas pelos detectores comuns de CLAE.

O primeiro procedimento analítico por CLAE para análise de fumonisinias envolveu a modificação do método de SYLER & GILCHRIST⁵⁹ para determinação de fitotoxinas de *Alternaria alternata*. Um derivativo maleil de FB₁, FB₂ e FB₃ foi preparado a partir do anidrido maléico para detecção a 230 nm^{04, 05, 10, 53} ou 250 nm¹⁵.

Este método foi satisfatório para análise de culturas de fungos, pois tais culturas possuem altos teores de fumonisinias, mas esta metodologia foi pouco sensível para amostras naturalmente contaminadas^{04, 30}. A sensibilidade na análise de fumonisinias por CLAE foi aumentada significativamente com a conversão para derivativos fluorescentes e, portanto, o uso de detectores de fluorescência.

A derivação pré-coluna da amina primária das fumonisinias tem sido amplamente utilizada na determinação por CLAE com detecção de fluorescência. A fluorescamina é um dos reagentes utilizados na derivação de fumonisinias^{18, 36, 37, 53}. Entretanto, o derivado fumonisinia-fluorescamina elui em dois picos devido a formação de derivados ácido/álcool e lactona, o que dificulta a determinação quantitativa dos analitos em questão. Segundo ROSS et alii³⁶, a razão dos dois picos foi constante quando utilizaram uma fase móvel de pH baixo, portanto ambos os picos foram usados para quantificação. Obtiveram assim um limite de detecção de 1 µg/g para FB₁ e 5 µg/g para FB₂. HOLCOMB et alii¹⁸ relataram que o uso de ácido acético na fase móvel diminui satisfatoriamente o tamanho do pico menor (lactona-fluorescamina) e o limite de detecção aumenta para 0,5 µg/g para FB₁.

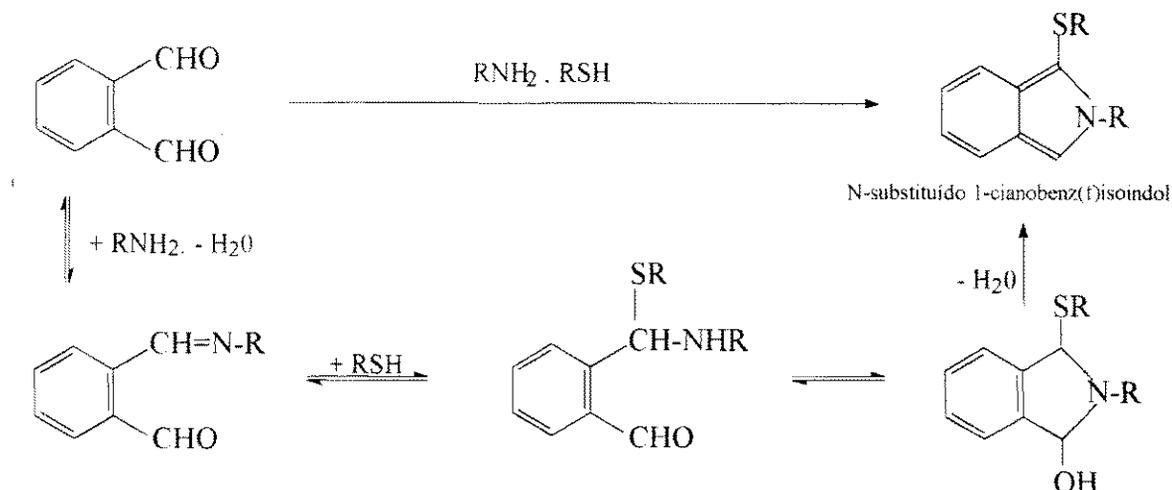


Figura 2 — Reação da amina primária da fumonisina com o o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol para formar um derivado N-substituído 1-cianobenz(f)isoindol (29).

O amplo uso do orto-ftaldialdeído (OPA) como agente na derivação para determinação de fumonisinas por CLAE deve-se à sua simplicidade e sensibilidade (limite de detecção de 50 ng FB₁/g e 100 ng FB₂/g) 49. Os derivados OPA-fumonisinas são preparados sob condições alcalinas (pH 9 a 10) na presença de 2-mercaptoetanol (Figura 2). SYDENHAM et alii⁵⁴ avaliaram a estabilidade do derivado e observaram que não há diferença significativa quando a injeção no cromatógrafo líquido ocorre até 4 minutos, entretanto, após 8 minutos, a resposta foi 95% da previamente observada e após 64 minutos, diminui 48% da leitura inicial. TRUCKSESS et alii⁶⁵ demonstraram que a intensidade máxima do derivado é obtida em 1 minuto após a adição do reagente OPA no extrato, e que a intensidade de fluorescência diminui 15% após 10 minutos e 30% após 1 hora da reação. Apenas RICE et alii³⁴ demonstraram que a reação completa entre o OPA e as fumonisinas ocorre em um pH

entre 8 a 8,5 e que não há alteração estatisticamente significativa no tempo de reação entre 4 a 40 minutos. Entretanto, o sinal cromatográfico é diminuído significativamente em um tempo menor que 4 minutos. Nesta técnica a razão de 20 mg de OPA e 20 µL de 2-mercaptoetanol em 10 mL de acetonitrila apresentou uma melhor resposta e estabilidade do derivado formado.

O procedimento de WARE et alii⁷¹ emprega o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) como agente na derivação para a detecção de fumonisinas em milho e seus derivados. O NDA reage com aminas primárias na presença do íon cianeto para formar um derivado 1-cianobenz(f)isoindol, como mostrado na figura 3.^{68,71} Este procedimento é sensível (limite de detecção de 10 ng FB₁/g) e o derivado é altamente estável, apenas 12 % do derivado NDA-fumonisina foi reduzido em um período de 25 horas.⁷¹ O derivado possui uma intensa banda de absorção UV em 250 nm e dois máximos de excitação fracos

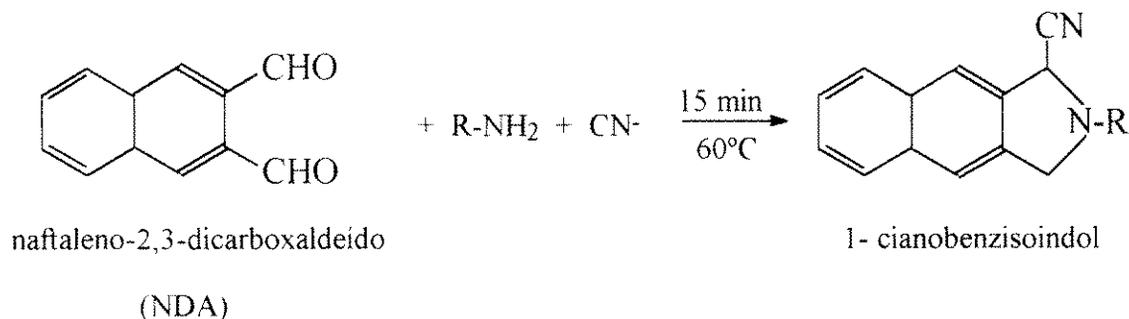


Figura 3 — Reação da amina primária da fumonisina com o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) na presença do íon cianeto para formar um derivado estável (08).

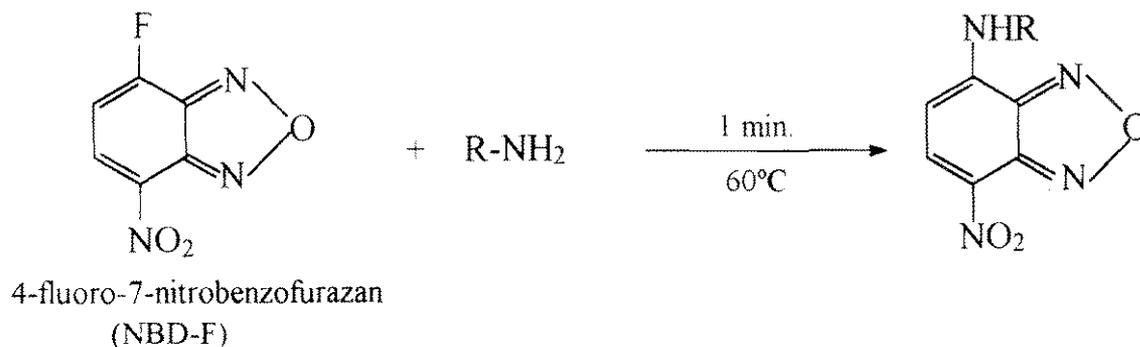


Figura 4 — Reação da amina primária da fumonisina com o 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) para formar um derivado estável (43).

na região visível em aproximadamente 420 e 440 nm. O comprimento de onda de 410 nm é o mais utilizado para excitação (exc) por apresentar menos interferentes na matriz⁷¹. WARE et alii⁷² indicaram que dois compostos fluorescentes são formados durante a reação de derivação do NDA com a FB₁ e que poderiam interferir na quantificação da FB₁, porém isto pode ser ajustado alterando a composição orgânica da fase móvel.

SCOTT & LAWRENCE^{43, 44} recomendaram o emprego do reagente 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) na determinação de fumonisinas. O NBD-F reage com o grupo amino primário das fumonisinas, onde o tempo de 1 minuto de reação a 60°C foi suficiente para ocorrer a formação do derivado (Figura 4). A estabilidade do derivado NBD-fumonisinina foi de aproximadamente 20 minutos⁴³, e a omissão de HCl 1 N na etapa de derivação aumentou a estabilidade dos derivados para cerca de 210 minutos⁴⁴. Entretanto, o derivado formado não foi suficientemente estável em procedimento automatizado⁰³.

Outros reagentes de derivação usados na determinação de fumonisinas por CLAE são: 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC - limite de detecção (LD) de 0,2 µg/g)¹⁹, 6-aminoquinolil N-hidroxissuccinimidilcarbamato (AccQ-Fluor - LD de 0,26 µg/g),⁶⁷ isotiocianato de fluoresceína (FITC - LD de 0,05 µg/g)²⁴ e o 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-F - LD de 10 ng/g)^{02, 03}.

MIYAHARA et alii²⁸ desenvolveram um método de alta sensibilidade (0,08 µg/g para FB₁ e FB₂), utilizaram cromatografia de par iônico e derivação pós-coluna. A reação de derivação das fumonisinas é realizada com OPA e N-acetil cisteína após a passagem destas pela coluna cromatográfica e detectadas por fluorescência cujo exc é 336 nm e o emissão é 460 nm.

O uso de detectores de massas ou espectrometria de massas para a detecção, identificação e quantificação de fumonisinas separadas por CLAE tem sido relatado

recentemente^{23, 61, 74} e demonstrado sensibilidade (limite de quantificação de 0,8 ng/g) e seletividade.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas tem sido usada em muitos estudos para a identificação e consequentemente, confirmação na análise de fumonisinas. BEZUIDENHOUT et alii⁶⁹ e PLATTNER et alii³² identificaram a FB₁ por espectrometria de massas de íon secundário (SIMS), pois o íon molecular formado por impacto de elétrons é muito instável, portanto, realizou-se a ionização química das moléculas de fumonisinas com isobutano a altas pressões (0,3 torr), formando o íon molecular protonado de m/z 722 para FB₁ e de m/z 706 para FB₂. A técnica acima requer que a amostra seja vaporizada antes da ionização, tornando difícil a análise de FB₁ por ser uma molécula lábil ou estar na forma ionizada. KORFMACHER et alii²² utilizaram técnicas de ionização alternativas como "thermospray", "electrospray" e "fast atom bombardment" e demonstraram que o "Electrospray Mass Spectrometry" (ESMS) e o "Fast-atom Bombardment Mass Spectrometry" (FABMS) são úteis na determinação de nanogramas do analito em questão, enquanto o "Thermospray Mass Spectrometry" (TSMS) analisa quantidades maiores (microgramas) de FB₁. A confirmação da presença de fumonisinas na amostra analisada é realizada com detectores de massas ou espectrômetros de massas acoplados ao cromatógrafo gasoso^{12, 33, 62, 68, 70} ou ao cromatógrafo líquido^{23, 61, 74}.

ELETROFORESE CAPILAR

As fumonisinas podem ser separadas por técnicas eletroforéticas devido a presença dos dois grupos de

ácido tricarbálfico em sua estrutura (Figura 1). MARAGOS²⁴ preparou derivados de FB₁, FB₂ e hidrolizado de FB₁ (HFB₁) com isotiocianato de fluoresceína e os analisou por eletroforese capilar (CZE) com detector de fluorescência. O limite de detecção relatado foi de 0,025 pg para FB₁. O problema do método é a possível decomposição das fumonisinas devido as condições de reação de derivação, como: longo tempo de reação (90 minutos), alta temperatura (60°C) e pH alcalino (9,5); o que levaria a resultados falsos negativos²⁸.

IMUNOENSAIOS

A produção de anticorpos para ensaios imunoenzimáticos (EIA) tem sido desenvolvida para a análise direta e indireta de fumonisinas^{06,07,11,25,38,45,52,66,75}. AZCONA-OLIVERA et alii^{06,07} obtiveram anticorpos monoclonais e policlonais, contra a FB₁, de linfócitos esplênicos de ratos imunizados com o conjugado FB1-toxina colérica. O teste direto competitivo ELISA baseado em anticorpos monoclonais foi desenvolvido, onde o conjugado FB1-peroxidase e FB₁ livre competem pelo anticorpo imobilizado nas placas^{07,25}. Se a micotoxina está presente na amostra (FB₁ livre) ela poderia se ligar ao anticorpo na placa, ao invés do conjugado FB₁-peroxidase, diminuindo a quantidade do sinal espectrofotométrico. O limite de detecção foi de 50 ng/mL para FB₁⁰⁷ e de 2 ng/mL para HFB₁²⁵. USLEBER et alii⁶⁶ e SCHNEIDER et alii³⁸ prepararam anticorpos policlonais contra FB₁, os quais foram também utilizados em um teste direto competitivo ELISA em placas e membranas, respectivamente. O limite de detecção para FB₁ foi de 0,17 ng/mL⁶⁶ no teste em placas e de 40-60 ng/g³⁸ em membranas para amostras de milho. As fumonisinas são super-estimadas em testes diretos competitivos ELISA como indicam os estudos comparativos^{31,52,55,57,60}, isto deve-se a matriz alimentar que aumenta a resposta inibitória no teste ELISA ou devido a reação cruzada entre compostos estruturalmente relacionados a FB₁.

SHELBY & KELLEY⁴⁷ descreveram um teste indireto competitivo ELISA para análise de FB₁ em milho com anticorpos monoclonais, onde o conjugado FB1-albumina bovina imobilizado e FB₁ livre competem pelo anticorpo anti-FB₁ livre. Se a micotoxina está presente na amostra (FB₁ livre), o anticorpo anti-FB₁ ligado à enzima ligaria-se a FB₁ da amostra ao invés da FB₁-albumina bovina imobilizada na placa, diminuindo a resposta espectrofotométrica. SHELBY et alii⁴⁸ compararam o método acima com o de ROTTINGHAUS et alii³⁷ por cromatografia em camada delgada, e observaram que o método de ELISA indicou uma maior quantidade de FB₁, devido a reação cruzada com as outras fumonisinas.

Outros métodos usados na determinação de fumonisinas por imunoenaios são o uso de imunossensor de fibra óptica⁶⁴ e a produção de anticorpos anti-idiotipo¹¹.

CONFIRMAÇÃO

A etapa final da metodologia analítica é a confirmação da identidade das fumonisinas. A confirmação do resultado analítico pode ser realizada através de derivação química, onde o derivado formado possui características cromatográficas distintas da micotoxina inalterada. Segundo ROTTINGHAUS et alii³⁷ um dos testes confirmatórios é a formação de amino-alcóois C²² a partir da hidrólise da FB₁ e FB₂ e análise por cromatografia em camada delgada, utilizando fluorescamina como agente revelador. A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo gasoso ou líquido de alta eficiência é um procedimento de confirmação altamente específico na análise de fumonisinas^{12,23,33,62,68,70}, onde a monitorização de três íons é preferível para a exatidão da identidade, para FB₁ são eles m/z 722, 406 e 187³². Estes métodos são seletivos e sensíveis, mas requerem equipamentos de alto custo. Procedimentos mais acessíveis e de menor custo são os imunoenaios, devido a especificidade pelo sucesso na produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra a FB₁, FB₂ e FB₃³⁰.

ESTUDOS COLABORATIVOS

Os estudos colaborativos inter-laboratoriais realizam uma rigorosa avaliação da exatidão, repetibilidade (variação intra-laboratorial) e reprodutibilidade (variação inter-laboratorial)⁴⁰. No estudo colaborativo o número mínimo de amostras analisadas por 8 ou mais laboratórios é cinco, sendo necessário realizar uma ou mais replicatas. Estes resultados serão analisados estatisticamente fornecendo dados sobre "outliers", erros sistemáticos, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), valores falso positivos e falso negativos.

Somente dois métodos publicados para análise de fumonisinas foram testados em estudos colaborativos⁵⁶.⁶³ e um estudo de intercomparação na Comunidade Européia⁶⁹. O método de SHEPHARD et alii⁶⁹ para determinação de FB₁ e FB₂ em milho foi estudado cooperativamente por 11 laboratórios⁶³. A variação intra-laboratorial foi de 7,7 a 25,5% para FB₁ e 12,5 a 36,8% para FB₂, enquanto a variação inter-laboratorial foi de 18 a 26,7% para FB₁ e 28 a 45,6% para FB₂. A razão HORRAT, que é a razão entre o desvio padrão relativo encontrado no estudo interlaboratorial e o desvio padrão calculado pela equação de Horwitz^{66,63}, demonstrou reproduti-

bilidade aceitável em todas as concentrações de FB_1 testadas e 4 das 5 concentrações de FB_2 analisadas, pois os valores foram inferiores a 2. A recuperação de FB_1 e FB_2 foi de 99,5 e 85,9%, respectivamente⁴⁹.

O segundo estudo colaborativo 56 envolveu 12 participantes e verificaram o método de SYDENHAM et alii⁵⁴, o qual baseia-se no método de SHEPHARD et alii⁴⁹ com acréscimo da FB_3 . A recuperação foi de 81,1 a 84,2%, 75,9 a 81,9% e 75,8 a 86,8% para FB_1 , FB_2 e FB_3 , respectivamente. A variação intra-laboratorial variou de 5,8 a 13,2% para FB_1 , de 7,2 a 17,5% para FB_2 e 8 a 17,2% para FB_3 . A variação inter-laboratorial variou de 13,9 a 22,2% para FB_1 , de 15,8 a 26,7% para FB_2 e 19,5 a 24,9% para FB_3 . A razão HORRAT variou de 0,75 a 1,73 demonstrando reprodutibilidade aceitável.

CONCLUSÃO

De acordo com as recomendações evidenciadas pelos diversos autores, pode-se concluir que:

- os métodos analíticos para a determinação de fumonisinas têm sido desenvolvidos, mas são necessários alguns melhoramentos para se tornarem mais exatos, baratos e rápidos.
- recuperações melhores têm sido obtidas com o uso de colunas de troca iônica forte (TAF) ao invés das colunas de fase reversa (C_{18}) na etapa de limpeza^{68, 54, 69}.
- imunoenaios são úteis para uma triagem rápida e confirmação dos resultados.
- a realização de estudos colaborativos inter-laboratoriais deve ser incentivada.

RIALA 07/842

M. MACHINSKI J. – Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Laboratório de Toxicologia. Av. Colombo, 5790. CEP 87020-900. Maringá – Pr. Fone (044) 262-4350.

SUMMARY: Fumonisin are mycotoxins produced by *Fusarium* spp. and occur in corn used for food and in corn-based animal feeds. They have been shown to cause equine leukoencephalomalacia (ELEM), porcine pulmonary edema (PPE), and liver cancer in rats. epidemiological data from South Africa and China have associated fumonisins with esophageal cancer. The present paper reviews the analytical methodology currently described in the literature for the determination of fumonisins in foods and feeds.

DESCRIPTORS: Fumonisin, analytical methods, foods, feeds.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ACKERMANN, T. - Fast thin-layer chromatography systems for fumonisin isolation and identification. *J. Appl. Toxicol.*, **11**: 451, 1991.
02. AKIYAMA, H.; MIYAHARA, M.; TOYODA, M.; SAITO, Y. - Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis. *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **112**: 112-117, 1994.
03. AKIYAMA, H.; MIYARA, M.; TOYODA, M.; SAITO, Y. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1 and B_2 in corn by precolumn derivatization with 4(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **36**(1): 77-81, 1995.
04. ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O. - Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. *Mycotoxin Res.*, **8**: 2-12, 1992.
05. ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SCHALKWYK, D.J.; BEHEREND, Y. - Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(6): 1729-1733, 1990.
06. AZCONA-OLIVERA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; PESTKA, J.J. - Generation of antibodies reactive with fumonisins B_1 , B_2 , and B_3 by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(1): 169-173, 1992.
07. AZCONA-OLIVERA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; PESTKA, J.J. - Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B_1 , B_2 , and B_3 . *J. Agric. Food Chem.*, **40**(3): 531-534, 1992.
08. BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. - Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *J. AOAC Int.*, **77**(2): 501-506, 1994.

09. BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. - Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **11**: 743-745, 1988.
10. BUCCI, T.; HANSEN, D. K.; La BORDE, J. B.; - Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gorged with mycotoxin Fumonisin B₁. *Natural Toxins* **4**:51-52, 1996.
11. CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. - Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.*, **39**(11): 1958-1962, 1991.
12. CHU, F.S.; HUANG, X.; MARAGOS, C.M. - Production and characterization of anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(1): 261-267, 1995.
13. CHUNG, S.H.; KIM, Y.B. - Natural occurrence of fumonisin B1 in Korean corn and rough rice. *Foods Biotechnol.*, **4**(3): 216-216, 1995.
14. COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R. - Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathol.*, **117**: 79, 1992.
15. DAWLATANA, M.; COKER, R.D.; NAGLER, M.J.; BLUNDEN, G. - A normal phase HPTLC method for the quantitative determination of fumonisin B1 in rice. *Chromatographia*, **41**(3/4): 187-190, 1995.
16. GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. - Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(7): 1806-1811, 1988.
17. GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. - Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, **12**: 1247-1251, 1991.
18. HANSEN, T.J.; ZABE, N.A.; SKIPPER, P.L. - Immunoaffinity isolation of fumonisin B1 and application to analysis in corn. *Abst. 106th AOAC Int. Ann. Mtg.*, 230, 1992. Apud: SCOTT, P.M. - Fumonisin. *Internat. Journal Food Microbiol.*, **18**, 257-270, 1993.
19. HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J.B.; CHIARELLI, M.P.; KORFMACHER, W.A.; THOMPSON Jr, H.C.; LAY Jr, J.O.; HANKINS, L.J.; CER-NIGLIA, C.E. - HPLC and FAB Mass Spectrometry analysis of fumonisins B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(3): 357-360, 1993.
20. HOLCOMB, M.; THOMPSON Jr, H.C.; HANKINS, L. J. - Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(5): 764-767, 1993.
21. HOPMANS, E.C.; MURPHY, P.A. - Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(10): 1655-1658, 1993.
22. JACKSON, M.A.; BENNETT, G.A. - Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(8): 2296-2298, 1990.
23. KORFMACHER, W.A.; CHIARELLI, M.P.; LAY Jr, J.O.; BLOOM, J.; HOLCOMB, M.; McMANUS, K.T. - Characterization of the mycotoxin fumonisin B₁; comparison of thermospray, fast-atom bombardment and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**: 463-468, 1991.
24. LUKACS, Z.; SCHAPER, S.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H.U. - Identification and determination of fumonisin FB₁ and FB₂ in corn and corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray-ionization Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). *Chromatographia*, **43**(3/4): 124-128, 1996.
25. MARAGOS, C.M. - Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(2): 390-394, 1995.
26. MARAGOS, C.M.; PLATTNER, R.D.; MIKLASZ, S.D. - Determination of hydrolysed fumonisin B₁ (HFB1) in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Add. Contam.*, **13**(1): 105-113, 1996.
27. MARAGOS, C.M.; RICHARD, J.L. - Quantitation and stability of fumonisins B₁ and B₂ in milk. *J. AOAC Internat.*, **77**(5): 1162-1167, 1994.
28. MEREDITH, F.I.; BACON, C.W.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P. - Preparative LC isolation and purification of fumonisin B₁ from rice culture. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(1): 195-198, 1996.
29. MIYHARA, M.; AKIYAMA, H.; TOYODA, M.; SAITO, Y. - New procedure for fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products by ion pair chromatography with o-phthalaldehyde postcolumn derivatization and fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(3): 842-847, 1996.
30. MONTIGNY, P.; STOBAUGH, J.F.; GIVENS, R.S.; CARLSON, R.G.; SRINIVASACHAR, K.;

- STERNSON, L.A.; HIGUCHI, T. - Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. *Anal. Chem.*, **59**(8): 1096-1101, 1987.
31. NORRED, W.P. - Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health*, **38**: 309-328, 1993.
32. PESTKA, J.J.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; PLATTNER, R.D.; MINERVINI, F.; DOKO, M.B.; VISCONTI, A. - Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J. Food Prot.*, **57**(2): 167-172, 1994.
33. PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; PETERSON, R.; SHACKELFORD, D.D.; WEISLEDER, D. - A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia*, **82**(6): 698-702, 1990.
34. RICE, L.G.; ROSS, P.F. - Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Prot.*, **57**(6): 536-540, 1994.
35. RICE, L.G.; ROSS, P.F.; DEJONG, J.; PLATTNER, R.D.; COATS, J.R. - Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. *J. AOAC Internat.*, **78**(4): 1002-1009, 1995.
36. ROSS, P.F.; LEDET, A.E.; OWENS, D.L.; RICE, L.G.; NELSON, H.A.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M. - Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**: 69, 1993.
37. ROSS, P.F.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; OWENS, D.L.; NELSON, H.A.; RICHARD, J.L. - Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathol.*, **114**: 129-135, 1991.
38. ROTTINGHAUS, G.E.; COATNEY, C.E.; MINOR, H.C. - A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**: 326-329, 1992.
39. SCHNEIDER, E.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. - Rapid detection of fumonisin B₁ in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay/enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(9): 2548-2552, 1995.
40. SCOTT, P.M. - Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**: 257-270, 1993.
41. SCOTT, P.M. - Mycotoxin methodology. *Food Add. Contam.*, **12**(3): 395-403, 1995.
42. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Analysis of beer from fumonisins. *J. Food Prot.*, **58**(12): 1379-1382, 1995.
43. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Determination of hydrolysed fumonisin B₁ in alkali-processed corn foods. *Food Add. Contam.*, **13**(7): 823-832, 1996.
44. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. AOAC Internat.*, **75**(5): 829-834, 1992.
45. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J. AOAC Internat.*, **77**(2): 541-545, 1994.
46. SCOTT, P.M.; YEUNG, J.M.; LAWRENCE, G.A.; PRELUSKY, D.B. - Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins. *Food Add. Contam.*, **14**(5): 445-450, 1997.
47. SELIM, M.I.; EL-SHARKAWY, S.H.; POPENDORF, W.J. - Supercritical fluid extraction of fumonisin B₁ from grain dust. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(10): 3224-3229, 1996.
48. SHELBY, R.A.; KELLEY, V. C. - Detection of fumonisins in corn by immunoassay. *Phytopathology*, **82**: 500, 1992.
49. SHELBY, R.A.; ROTTINGHAUS, G.E.; MINOR, H.C. - Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detection of fumonisin on maize. *J. Agric. Food Chem.*, **42**(9): 2064-2067, 1994.
50. SHEPARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. - Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.*, **13**(10): 2077-2087, 1990.
51. SHEPARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. - Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **574**: 299-304, 1992.
52. STACK, M.E.; EPPLEY, R.M. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. *J. AOAC Internat.*, **75**(5): 834-837, 1992.
53. SUTIKNO; ABOUZIED, M.M.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; HART, L.P.; PESTKA, J.J. - Detection of fumonisins in *Fusarium* cultures, corn, and corn products by polyclonal antibody-based ELISA: relation to fumonisin B₁ detection by liquid chromatography. *J. Food Prot.*, **59**(6): 645-651, 1996.

54. SYDENHAM, E.W.; GELDERBLUM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. - Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **38**(1): 285-290, 1990.
55. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. *J. AOAC Internat.*, **75**(2): 313-318, 1992.
56. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; BIRD, C.; MILLER, B.M. - Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(1): 159-164, 1996.
57. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; SCHALKWYK, D.J. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *J. AOAC Internat.*, **79**(3): 688-695, 1996.
58. SYDENHAM, E.W.; STOCKENSTRÖM, S.; THIEL, P.G.; RHEEDER, J.P.; DOKO, M.B.; BIRD, C.; MILLER, B.M. - Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC methods for the determination of fumonisins in corn: a comparative study. *J. Food Prot.*, **59**(8): 893-897, 1996.
59. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R. - Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.*, **38**(10): 1900-1903, 1990.
60. SYLER, D.J.; GILCHRIST, D.J. - Determination of host-selective phytotoxins from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* as their maleyl derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **238**: 167-173, 1982.
61. TEJADA-SIMON, M.V.; MAROVATSANGA, L.T.; PESTKA, J.J. - Comparative detection of fumonisin by HPLC, ELISA, and immunocytochemical localization in *Fusarium* cultures. *J. Food Prot.*, **58**(6): 666-672, 1995.
62. THAKUR, R.A.; SMITH, J.S. - Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, an meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(4): 1047-1052, 1996.
63. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. - The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathol.*, **117**: 3-9, 1992.
64. THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J. - Study of the reproducibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. *J. AOAC Internat.*, **76**(2): 361-366, 1993.
65. THOMPSON, V.S.; MARAGOS, C.M. - Fiber-optic immunosensor for the detector of fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(4): 1041-1046, 1996.
66. TRUCSESS, M.W.; STACK, M.E.; ALLEN, S.; BARRION, N. - Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisins B₁ in canned and frozen sweet corn. *J. AOAC Internat.*, **78**(3): 705-710, 1995.
67. USLEBER, E.; STRAKA, M.; TERPLAN, G. - Enzyme immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn-based food. *J. Agric. Food Chem.*, **42**(6): 1392-1396, 1994.
68. VELÁZQUEZ, C.; BLOEMENDAL, C.; SANCHIS, V.; CANELA, R. - Derivation of fumonisins B₁ and B₂ with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(6): 1535-1537, 1995.
69. VESONDER, R.; PETERSON, R.; PLATTNER, R.D.; WEISLEDER, D. - Fumonisin B₁: isolation from corn culture, and purification by high performance liquid chromatography. *Mycotoxin Res.*, **6**: 85-88, 1990.
70. VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; SOLFRIZZO, M.; PASCALE, M.; BOENKE, A. - European intercomparison study for the determination of fumonisins in maize. *Mikrochim. Acta*, **123**: 55-61, 1996.
71. VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; BACON, C.W.; NORRED, W.P. - Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathol.*, **112**: 81-92, 1990.
72. WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN Jr., A.; CARTER, L.; BENNETT, G.A. - Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Letters*, **26**(8): 1751-1770, 1993.
73. WARE, G.M.; UMRIGAR, P.; CARMAN Jr., A.; KUAN, S.S. - Evaluation of fumonitest immunoaffinity columns. *Anal. Letters*, **27**(4): 693-715, 1994.
74. WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; RICE, L.G. - Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 213-216, 1990.

75. XIE, W.; MIROCHA, C.J.; CHEN, J. - Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B₁ in corn by on-line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(4): 1251-1255, 1997.
76. YEUNG, J.M.; PRELUSKY, D.B.; SAVARD, M.E.; DANG, B.D.; ROBINSON, L.A. - Sensitive immunoassay for fumonisin B₁ in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(11): 3582-3586, 1996.

Recebido para publicação em 08/04/98

ISOLAMENTO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR XENOCULTURA APÓS APLICAÇÃO DE XENODIAGNÓSTICO *IN VIVO* E/OU *IN VITRO* EM PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS E NA CO-INFECÇÃO PELO HIV*

Márcia da Conceição BISUGO**
Maria de Fátima Lerenó de ARAÚJO**
Elizabeth Visone NUNES **
Elaine Aparecida CUNHA**
Oswaldo da Cruz OLIVEIRA JUNIOR**
Carmem do Socorro GUILHERME**
Lorena Perez RAMIREZ***
José Eduardo TOLEZANO**

RIALA 07/843

BISUGO, M.C., ARAÚJO, M.F.L., NUNES, E.V., CUNHA, E.A., OLIVEIRA JR., O.C.; GUILHERME, C.S., RAMIREZ, L.P. & TOLEZANO, J.E. — Isolamento, através da xenocultura, de amostras de *Trypanosoma cruzi* de pacientes na fase crônica da doença de Chagas e na co-infecção pelo HIV. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 89-96, 1998.

RESUMO: Neste estudo objetivou-se avaliar a viabilidade da utilização da xenocultura como técnica para o isolamento de amostras de *Trypanosoma cruzi* a partir do trato intestinal de *Triatoma infestans*. Foram realizadas xenoculturas a partir de xenodiagnósticos aplicados em 78 pacientes, procedentes de diferentes regiões do Brasil, todos em fase crônica da doença de Chagas, sendo 32 co-infectados pelo HIV. Foram aplicados no total 101 xenodiagnósticos, executados "in vivo" e/ou "in vitro" com 30-40 ninfas de *T. infestans* entre 3^a e 4^a estádios de desenvolvimento. Ao final dos exames dos xenodiagnósticos, aos 30 e 60 dias, o trato digestivo de um número variável de triatomíneos de cada exame foi semeado, individualmente, após tratamento com álcool iodado, em meios bifásicos de Ducrey com LIT ou BHI (com gentamicina). As culturas foram examinadas quinzenalmente até 3 meses e, as amostras isoladas estão preservadas em nitrogênio líquido. Dos 101 xenodiagnósticos aplicados, 73 (72,3%) foram positivos, correspondendo a 57 (73,1%) dos 78 pacientes. Em 51 (89,5%) dos 57 pacientes (26 co-infectados e 31 em fase crônica da doença de Chagas) com xenodiagnóstico positivo, o isolamento do parasita foi viabilizado pela utilização da xenocultura. O isolamento de *T. cruzi* foi da ordem de 96,2% (25/26) entre os pacientes co-infectados e 83,9% (26/31) entre aqueles soronegativos para HIV. De 461 barbeiros positivos aos exames do xenodiagnóstico "in vivo" ou "in vitro", foi possível o isolamento de 250 (54,2%) amostras de *T. cruzi*. De 181 insetos reconhecidos como negativos nos xenodiagnósticos positivos, foi conseguido o isolamento de 25 (13,8%) amostras do parasita. Mesmo entre 22 ninfas mortas, para as quais nem houvera sido possível o exame, por compressão do abdomen, no xenodiagnóstico, a xenocultura viabilizou o isolamento de mais 2 (9,1%) amostras de *T. cruzi*. Em nenhum xenodiagnóstico reconhecido como negativo foi obtido êxito para o isolamento deste protozoário. Foi observada uma perda de cerca de 5% das xenoculturas por contaminação bacteriana ou fúngica. Verificou-se, ainda, uma aparente melhor adaptação de formas delgadas do parasita nos meios de cultivo. Além de possibilitar o isolamento de *T. cruzi* em cerca de 90% dos pacientes com xenodiagnósticos positivos e de mais da metade dos triatomíneos infectados, a xenocultura viabilizou o reconhecimento e o isolamento do parasita em cerca de 13,3% (27/203) dos insetos que estavam mortos ou tinham sido identificados como negativos em xenodiagnósticos positivos.

DESCRITORES: *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; co-infecção *T. cruzi*/HIV; isolamento; xenocultura; AIDS.

* Realizado na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz

** Do Instituto Adolfo Lutz — São Paulo — Brasil

*** Da ORSTOM Montpellier — França

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas pode ser realizado, tanto na fase aguda como na fase crônica, através da utilização de procedimentos técnicos incluídos no que se convencionou chamar de método parasitológico, que objetiva a demonstração direta da presença de *Trypanosoma cruzi*. Alternativamente e, de maneira mais rotineira tal diagnóstico tem sido executado pelo emprego das mais diferentes técnicas de demonstração indireta da presença do parasita pela detecção e dosagem de anticorpos anti-*T. cruzi*, no método imunológico^{5,6,7,8,11}.

Relativamente ao método parasitológico, para o diagnóstico na fase crônica desta parasitose, duas técnicas laboratoriais, a hemocultura e o xenodiagnóstico, nas suas mais diferentes versões, modificações e condições de execução, tem sido aquelas sobre as quais recaem as preferências da grande maioria de pesquisadores^{5,27}, com resultados os mais variados, desde a impossibilidade de demonstração da presença de *T. cruzi* até 100% de positividade^{1,2,6,10,13,15,16,17,19,20,21,22,23}.

O xenodiagnóstico, proposto por BRUMPT em 1914⁴ e, por ele chamado de “cultura natural em hospedeiro favorável” é, ainda hoje, utilizado com objetivos de diagnóstico, para isolamento do parasita, controle de tratamento e avaliação da eficiência de drogas anti-*T. cruzi*²⁰.

O isolamento e a preservação de agentes etiológicos assumem importância em Saúde Pública, na medida em que possibilitam estudos sobre a caracterização genética, correlações com quadros clínicos, patogenicidade, reconhecimento de marcadores epidemiológicos, podendo, também, contribuir para o desenvolvimento e aprimoramento de provas de resistência e susceptibilidade a drogas, entre outros.

A dissecação ou a homogeneização dos triatomíneos podem representar alternativas para a melhoria da sensibilidade do xenodiagnóstico como, também, para tentativa de isolamento de *T. cruzi*,^{14,23}. O procedimento laboratorial que associa o xenodiagnóstico com a cultura, a seguir sempre referido neste trabalho como xenocultura, consistiu da semeadura em meio de cultivo, do conteúdo intestinal de barbeiros utilizados em xenodiagnósticos aplicados em pacientes com doença de Chagas.

No presente estudo objetivou-se avaliar a viabilidade da utilização da xenocultura como técnica capaz de possibilitar uma melhoria na sensibilidade do xenodiagnóstico e o isolamento de amostras de *Trypanosoma cruzi* a partir do trato intestinal de triatomíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES — Ao todo, 78 pacientes procedentes de diferentes regiões do Brasil, todos em fase crônica da doença de Chagas, sendo 32 co-infectados pelo HIV (Tabela 1).

TRIAMOMÍNEOS — Para a realização dos xenodiagnósticos foram utilizadas ninfas de *Triatoma infestans*, entre o 3^a e o 4^a estádios de desenvolvimento, mantidas em jejum 15 dias antes de sua utilização, todas oriundas do insetário de criação de triatomíneos da Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz.

XENODIAGNÓSTICOS — No total, foram aplicados 101 xenodiagnósticos sendo 53 (52,5%) nos pacientes co-infectados e 48 (47,5%) nos pacientes em fase crônica da doença de Chagas e soronegativos para HIV. Esses xenodiagnósticos foram executados “in vivo” (54 = 53,5%) e/ou “in vitro” (47 = 46,5%), com 30-40 ninfas de *T. infestans*. Após a aplicação dos xenodiagnósticos os barbeiros foram mantidos em jejum até o final das observações. Os insetos foram examinados, individualmente, por compressão abdominal, para a pesquisa de infecção por *Trypanosoma cruzi*, aos 30 e 60 dias após o repasto sanguíneo efetivado com o sangue dos pacientes, sendo dissecados assim que observada a infecção por *Trypanosoma cruzi* na primeira ou segunda leitura.

XENOCULTURA — Ao final dos exames, um número variável de triatomíneos (vivos), antes da dissecação foram submersos individualmente em solução de álcool iodado por período entre 30 e 60 segundos e processados em capela de fluxo laminar, visando a eliminação e/ou drástica redução de contaminantes. Cada trato digestivo foi semeado em meio bifásio de Ducrey com LIT ou BHI (com gentamicina a 50(μ ml). Ao todo foram dissecadas 461 e 399 ninfas, respectivamente de xenodiagnósticos positivos e negativos para a infecção por *T. cruzi*. Excepcionalmente foram dissecadas 22 ninfas mortas, sendo 20 provenientes de xenodiagnósticos positivos e 2 de xenodiagnósticos negativos. As culturas foram examinadas quinzenalmente até três meses e, as amostras de *T. cruzi* isoladas foram preservadas em nitrogênio líquido para estudos posteriores.

ANÁLISE DOS RESULTADOS — Os resultados foram analisados estatisticamente pela utilização de teste de qui quadrado com e sem coeficiente de correção de Yates,^{9,12}.

TABELA 1
DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS OU CO-INFECTADOS PELO QUE FORAM SUBMETIDOS AO XENODIAGNÓSTICO *IN VIVO* E/OU *IN VITRO*.

PACIENTES ¹	XENODIAGNÓSTICOS											
	IN VIVO			IN VITRO			IN VIVO/IN VITRO			TOTAL		
	P	N	ST	P	N	ST	P	N	ST	TP	TN	TG
DOENÇA DE CHAGAS-SORONEGATIVOS PARA HIV	19 90,5%	2 9,5%	21 100,0%	12 50,0%	12 50,0%	24 100,0%	0 0,0%	1 100%	1 100%	31 67,4%	15 32,6%	46 100,0%
CO-INFECTADOS- <i>Trypanosoma cruzi</i> /HIV	9 69,2%	4 30,8%	13 100,0%	6 75,0%	2 25,0%	8 100,0%	11 ² 100,0%	0 0,0%	11 100,0%	26 81,2%	6 18,8%	32 100,0%
TOTAL	28 82,4%	6 17,6%	34 100,0%	18 56,3%	14 43,7%	32 100,0%	11 91,7%	1 8,3%	12 100,0%	57 73,1%	21 26,9%	78 100,0%

1- Para alguns pacientes foram aplicados dois ou mais xenodiagnósticos de uma mesma modalidade, "in vivo" ou "in vitro"

2- Dos 11 pacientes para os quais, simultaneamente, foram aplicados xenodiagnósticos "in vivo" e "in vitro", todos tiveram exames positivos para a presença de *T. cruzi*, sendo em 6 pacientes para as duas modalidades, 4 apenas para a forma "in vivo" e, 1 somente "in vitro".

P- número de pacientes com algum xenodiagnóstico positivo para a presença de *T. cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.

N- número de pacientes com xenodiagnóstico negativo para a presença de *T. cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.

ST- subtotal do número de pacientes

TP- número total de pacientes com algum xenodiagnóstico positivo para a presença de *T. cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.

TN- número total de pacientes com xenodiagnóstico negativos para a presença de *T. cruzi* ao exame do conteúdo intestinal de triatomíneos.

TG- número total de paciente

RESULTADOS

XENODIAGNÓSTICOS — Do total de 78 pacientes com doença de Chagas, 57(73,1%) foram positivos em um ou mais xenodiagnósticos aplicados, independentemente da modalidade técnica utilizada, "in vivo" e/ ou "in vitro" ou a situação clínica, com ou sem co-infecção pelo HIV (TABELA 1). Quando da simultaneidade de utilização das modalidades do xenodiagnóstico "in vivo" e "in vitro" em algumas situações o diagnóstico foi positivo somente para uma das técnicas. Foi observado, também, mais pacientes com xenodiagnósticos positivos

entre aqueles co-infetados pelo HIV (TABELA 1). Análise estatísticas dessas diferenças indicou ao teste de qui quadrado com coeficiente de correção de Yates de 1,96, não significativo para $P < 0,05$

Dos 101 xenodiagnósticos realizados, 73(72,3%) foram positivos para a presença de *T. cruzi* (TABELA 2). Dentre esses 73 exames verificou-se percentuais de positividade ligeiramente superiores entre os pacientes co-infetados com 79,2% e 64,6% entre os soronegativos para HIV (TABELA 2). Essas diferenças porém, revelaram-se estatisticamente não significantes ao teste de qui quadrado para $P < 0,05$.

TABELA 2

RESULTADO FINAL E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS DOS XENODIAGNÓSTICOS, APOS APLICAÇÃO "IN VIVO" OU "IN VITRO" EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS OU CO-INFECTADOS PELO HIV.

PACIENTES	IN VIVO			IN VITRO			TOTAL		
	P	N	ST	P	N	ST	TP	TN	TG
DOENÇA DE CHAGAS-SORONEGATIVOS PARA HIV¹	19 82,6%	4 17,4%	23 100,0%	12 48,0%	13 52,0%	25 100,0%	31 64,6%	17 35,4%	48 100%
CO-INFECTADOS-<i>Trypanosoma cruzi</i>/HIV²	24 77,4%	7 22,6%	31 100,0%	18 81,8%	4 18,2%	22 100,0%	42 79,2%	11 20,8%	53 100,0%
TOTAL	43 79,6%	11 20,4%	54 100,0%	30 63,8%	17 36,2%	47 100,0%	73 72,3%	28 27,7%	101 100,0%

- 1** - Total de 46 pacientes em fase crônica da doença de Chagas e soronegativos para HIV.
2 - Total de 32 pacientes em fase crônica da doença de Chagas e co-infetados para HIV.
P - Xenodiagnósticos com resultado final positivo para a presença de *Trypanosoma cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.
N - Xenodiagnósticos com resultado final negativo para a presença de *Trypanosoma cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.
ST - Subtotal do número de xenodiagnósticos aplicados.
TP - Total de xenodiagnósticos com resultado final positivo para a presença de *T. cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.
TN - Total de xenodiagnósticos com resultado final negativo para a presença de *T. cruzi* ao exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos.
TG - Total geral do número de xenodiagnósticos aplicados.

XENOCULTURAS — Em 51(89,5%) dos 57 pacientes com pelo menos um xenodiagnóstico positivo, o isolamento de uma ou mais amostras de *T. cruzi* foi viabilizado pela utilização das técnicas da xenocultura (TABELA 3). Verificou-se um maior sucesso no isolamento de amostras de *T. cruzi*, entre os barbeiros de xenodiagnósticos positivos dos pacientes co-infetados(TABELA 3). Dos 26 pacientes co-infetados, com xenodiagnóstico positivo, o isolamento de *T. cruzi* foi possível de 25(96,2%) deles, enquanto entre os 31 soronegativos de 26(83,9%) foi obtido o mesmo sucesso. Essas diferenças mostraram-se significativas ao teste do qui quadrado com coeficiente de correção de Yates, para $P < 0,05$.

Dentre as 461 ninfas de *T. infestans* positivas para *T. cruzi*, aos exames dos xenodiagnósticos "in vivo" e/ou "in vitro", foi possível o isolamento de 250(54,2%) amostras do parasita (TABELA 4).

Dos 181 insetos reconhecidos como negativos nos xenodiagnósticos com resultado final positivo, foi conseguido o isolamento de 25(13,8%) amostras de *T. cruzi* (TABELA 4). Do total de 275 amostras de *T. cruzi* isola-

das pela xenocultura, as 25(9,1%) obtidas de barbeiros negativos aos xenodiagnósticos de Chagas representam o potencial de aumento da sensibilidade deste tradicional método de diagnóstico da doença de Chagas. Das 218 ninfas de xenodiagnósticos com resultado final negativo, em nenhuma ocasião foi isolado *T. cruzi* (TABELA 4).

O número de amostras de *T. cruzi* isoladas pela utilização da técnica da xenocultura foi significativamente maior, pelo teste do qui quadrado ao nível de $P < 0,05$, entre todos os triatomíneos de xenodiagnósticos "in vivo" e/ou "in vitro" aplicados nos pacientes co-infetados 201/508(39,6%) do que entre aqueles soronegativos para HIV 74/352(21,0%) (TABELA 4).

Pela Tabela 4, também, é possível observar que maior número de isolamentos de *T. cruzi* foi conseguido dentre as ninfas dissecadas de xenodiagnósticos positivos aplicados nos pacientes co-infetados, com qui quadrado significante, para $P < 0,05$.

Dentre os 22 barbeiros, mortos anteriormente aos exames do xenodiagnóstico, a xenocultura viabilizou o isolamento de 2(9,1%) amostras de *T. cruzi* (TABELA 4).

TABELA 3
 RESULTADOS DAS TENTATIVAS DE ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DE *T. CRUZI* DOS PACIENTES, COM DOENÇA DE CHAGAS OU CO-INFECTADAS PELO HIV, A PARTIR DA DISSECAÇÃO E SEMEADURA DO TRATO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS UTILIZADOS NOS XENODIAGNÓSTICOS POSITIVOS.

PACIENTES	XENOCULTURAS					
	P		Nº		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
DOENÇA DE CHAGAS-SORONEGATIVOS PARA HIV	26	83,9	5	16,1	31	100,0
CO-INFECTADOS- <i>Trypanosoma cruzi</i> /HIV	25	96,2	1	3,8	26	100,0
TOTAL	51	89,5	6	10,5	57	100,0

P – Número e percentual de pacientes com pelo menos um xenodiagnóstico positivo com xenoculturas positivas para o isolamento de amostras de *T. cruzi*.

N – Número e percentual de pacientes com pelo menos um xenodiagnóstico positivo com xenoculturas negativas para as tentativas de isolamento de amostras de *T. cruzi*.

Deve ser registrada a observação da perda de aproximadamente 5% das xenoculturas por contaminação bacteriana ou fúngica.

Observou-se, ainda, uma aparente melhor adaptação de formas delgadas do parasita no cultivo em meios acelulares escolhidos.

DISCUSSÃO

O resultado final dos exames do conteúdo intestinal dos triatomíneos utilizados neste estudo, nos xenodiagnósticos realizados “in vivo” e/ou “in vitro” nos pacientes, com doença de Chagas ou co-infetados pelo HIV, com 73,1% de positividade, confirmando a presença de *T. cruzi* (TABELA 1), situa-se em patamar equivalente aos melhores desempenhos obtidos para esta metodologia diagnóstica^{2,6,17,19,23,24,25,26}.

O total de xenodiagnósticos positivos, 73/101 (72,3%), revela para a amostra estudada, níveis de parasitemia relativamente altos entre os pacientes, sendo o mesmo já registrado por PEREIRA et al¹⁸. Deve ser ressaltado, também, que os resultados conseguidos nos xenodiagnósticos aplicados nos indivíduos co-infetados (TABELA 2) guardam similaridade com as observações descritas por SARTORI et al²⁵ e OLIVEIRA Jr et al¹⁷ que aventaram ser maior nível de parasitemia, nos pacientes em fase crônica da doença de Chagas co-infetados pelo

HIV, resultado da manifestação de um caráter oportunista do *T. cruzi* em situação de imunodepressão no hospedeiro, provocada pelo agente da imunodeficiência adquirida. Por outro lado, o próprio valor de nível de parasitemia, expresso pelo número e percentual de triatomíneos positivos para *T. cruzi* nos exames do xenodiagnóstico parece ser parâmetro indicativo de prognóstico de evolução clínica¹⁸, principalmente no que concerne a possibilidade de reativação aguda da doença de Chagas, com complicações cardíacas e/ou neurológicas, nos pacientes co-infetados pelo HIV¹⁷. Níveis de parasitemia suficientes para obtenção de mais de 50-60% dos barbeiros utilizados nos xenodiagnósticos “in vivo” poderiam significar um mal prognóstico para a reativação da doença de Chagas²¹.

A xenocultura mostrou-se, neste estudo, importante ferramenta possibilitando o isolamento de amostras de *T. Cruzi*, de cerca de 90% (89,5%) dos pacientes com xenodiagnóstico positivo (TABELA 3). Em relação as tentativas de isolamento do parasita, mais uma vez verificou-se êxito significativamente maior (96,2%), neste intento, entre as ninfas de *T. infestans* utilizadas nos xenodiagnósticos positivos aplicados nos pacientes co-infetados, revelando, mais uma vez, a maior parasitemia naqueles pacientes por significar possibilidade real de ingestão, pelos barbeiros, no repasto sanguíneo, realizado “in vivo” ou “in vitro”, de maior número de parasi-

tas que evoluindo em seu trato digestivo-intestinal facilitam sua evidenciação e isolamento.

Do total de 461 ninfas reconhecidas como positivas para a presença de *T. cruzi* aos exames dos xenodiagnósticos positivos em 250 delas foi obtido sucesso no isolamento do protozoário (TABELA 4), ou seja em mais de 54% das tentativas.

A xenocultura significou, ainda, aumento na sensibilidade do xenodiagnóstico, sendo a ele associado, com o isolamento de *T. cruzi* em 25(13,8%) dos 181 barbeiros reconhecidos como negativos em xenodiagnósticos que tiveram resultado final positivo. Em relação ao total de positividade e isolamento deste agente, a dissecação e a xenocultura possibilitaram aumentar a sensibilidade de detecção de *T. cruzi* em 9,1%(25/275) (TABELA 4).

O encontro de positividade e isolamento de 2 amostras de *T. cruzi* em triatomíneos já mortos não é fato inédito uma vez que é conhecido que este parasita sobrevive no interior do hospedeiro invertebrado por vários dias, mesmo após sua morte²⁸. Acrescidas estas 2 amostras àquelas 25 de barbeiros negativos alcança-se 27/275 (9,8%) que se traduz com um aumento da sensibilidade do xenodiagnóstico em revelar triatomíneos infectados no repasto sanguíneo realizado "in vivo" ou "in vitro" com sangue dos pacientes com doença de Chagas. Pode-se, finalmente, aceitar como bastante razoável a perda cerca de 5% das xenoculturas, reconhecidas entre os resultados negativos, por contaminação bacteriana ou fúngica, o que significa ser eficiente o prévio tratamento dos triatomíneos em solução de álcool iodado visando a diminuição de contaminantes anteriormente a dissecação e sementeira em meio de cultura de seu trato intestinal.

A aparente melhor adaptação das formas delgadas de *T. cruzi* observadas nos meios de cultivo submetidos a repiques quinzenais, pode ser consequência de diferenças na fisiologia e competência de evolução, como discutido por BRENER³.

CONCLUSÕES

Além de possibilitar o isolamento de *Trypanosoma cruzi* em cerca de 90% dos pacientes com doença de Chagas ou co-infectados pelo HIV e, em mais de 54% dos triatomíneos reconhecidos como infectados no repasto sanguíneo do xenodiagnóstico, realizado "in vivo" ou "in vitro", a xenocultura viabilizou a demonstração e o isolamento do parasita em mais 27 barbeiros que estavam mortos ou tinham sido identificados como negativos nos xenodiagnósticos positivos.

A xenocultura favoreceu a um aumento da sensibilidade do xenodiagnóstico em 9,8% (27/275) para detecção e isolamento de *T. cruzi* de triatomíneos infectados no repasto sanguíneo efetivado, "in vivo" ou "in vitro" em pacientes com doença de Chagas com ou sem co-infectado pelo HIV.

Confirmou-se finalmente, que em situações de co-infecção *T. cruzi*/HIV os níveis de parasitemia tendem a ser maiores do que entre pacientes infectados por *T. cruzi* porém soronegativos para HIV, isto representado pelas maiores positivities obtidas nos xenodiagnósticos e no isolamento do agente parasitário.

TABELA 4
RESULTADO FINAL E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS DAS XENOCULTURAS OBTIDAS A PARTIR DA DISSECAÇÃO DE NINFAS DE TRIATOMÍNEOS INFESTADOS UTILIZADAS EM XENODIAGNÓSTICOS REALIZADOS IN VIVO OU IN VITRO EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS OU CO-INFECTADOS PELO HIV.

PACIENTES	NINFAS DE XENODIAGNÓSTICO POSITIVO									NINFAS DE XENODIAGNÓSTICO NEGATIVO									TOTAL		
	IN VIVO ²						IN VITRO ³			IN VIVO ²			IN VITRO ³			TP	TN	TG			
	P	N	ST	P	N	ST	P	N	ST	P	N	ST	P	N	ST						
DOENÇA DE CHAGAS-SORONEGATIVOS PARA HIV	58 46,6 %	72 55,4 %	130 100, %	4 3,5 %	43 91,5 %	47 100, %	10 33,3 %	20 66,7 %	30 100, %	2 6,9 %	27 93,1 %	29 100, %	0 0,0 %	22 100, %	22 100, %	0 0,0 %	94 100, %	94 100, %	74 21,0 %	278 79,0 %	352 100, %
TOTAL DE XENODIAGNÓSTICOS	19						12			4			13			48					
CO-INFECTADOS- <i>Trypanosoma cruzi</i> /HIV	129 69,0 %	58 31,0 %	187 100, %	19 19,1 %	86 81,9 %	105 100, %	53 46,5 %	61 53,5 %	114 100, %	*	*	*	0 0,0 %	70 100, %	70 100, %	0 0,0 %	32 100, %	32 100, %	201 39,6 %	307 60,4 %	508 100, %
TOTAL DE XENODIAGNÓSTICOS	24						18			7			4			53					
TOTAL	187 59,0 %	130 41,0 %	317 100, %	23 19,1 %	129 84,9 %	152 100, %	63 43,7 %	81 56,3 %	144 100, %	2 6,9 %	27 93,1 %	29 100, %	0 0,0 %	92 100, %	92 100, %	0 0,0 %	126 100, %	126 100, %	275 32, %	585 68,0 %	860 100, %
TOTAL DE XENODIAGNÓSTICOS	43						30			11			17			8					

Legendas referentes à TABELA 4:

- 1 Um total de mais 8 ninfas mortas, utilizadas em xenodiagnósticos aplicados em pacientes soronegativos para HIV, foram dissecações para a xenocultura, porém sem sucesso para o isolamento de amostras de *T. cruzi*.
- 2 Um total de mais 10 ninfas mortas, utilizadas em xenodiagnósticos aplicados em pacientes co-infectados, foram dissecações para a xenocultura sendo isolada uma amostra de *T. cruzi*.
- 3 Um total de mais 4 ninfas mortas, utilizadas em xenodiagnósticos aplicados em pacientes co-infectados, foram dissecações para a xenocultura sendo isolada uma amostra de *T. cruzi*.
- 4 e 5 - Nos exames de xenodiagnósticos com resultado final negativo aos 30 ou 60 dias após a aplicação, tanto para os procedimentos *in vivo* quanto *in vitro* não houveram ninfas positivas para a infecção por *T. cruzi*.
- P - Número de ninfas de *Triatoma infestans*, dissecações, das quais a xenocultura resultou positiva quanto ao isolamento de amostras de *T. cruzi*.
- N - Número de ninfas de *T. infestans*, dissecações, das quais a xenocultura resultou negativa quanto a tentativa de isolamento de amostra de *T. cruzi*.
- ST - Subtotal do número de ninfas de *T. infestans*, dissecações para a xenocultura na tentativa de isolamento de amostras de *T. cruzi*.
- TP - Total de ninfas de *T. infestans*, dissecações, das quais a xenocultura resultou positiva quanto ao isolamento de amostras de *T. cruzi*.
- TN - Total de ninfas de *T. infestans*, dissecações, das quais a xenocultura resultou negativa quanto a tentativa de isolamento de amostras de *T. cruzi*.
- TG - Total geral de ninfas de *T. infestans*, dissecações para a xenocultura na tentativa de isolamento de amostras de *T. cruzi*.

* - Não realizado

BISUGO, MC, ARAÚJO, MFL, NUNES, EV, CUNHA, EA, OLIVEIRA Jr, OC, GUILHERME, CS, RAMIREZ, LP & TOLEZANO, JE — *Trypanosoma cruzi* isolation from xenoculture after *in vivo* and/or *in vitro* xenodiagnosis executed in Chagasic or co-infected with HIV patients. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 89-96.

ABSTRACT: The aim of this study was the evaluation of the performance of xenoculture as technical procedure for isolation of *T. cruzi* from intestinal contents of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis applied in 78 patients, from different states of Brazil, all of them in chronic phase of Chagas' disease, being 32 co-infected by HIV. A total of 101 xenodiagnosis were done, "in vivo" and/or "in vitro", with 30-40 *T. infestans* between third and fourth instar of development. At the end of xenodiagnosis examinations, a variable number of triatomines from each examination were seed, individually after iodine alcohol treatment, in biphasic medium Ducrey with LIT or BHI (with gentamicine). The cultures were examined every fifteen days until three months and, isolates preserved in liquid nitrogen. From 101 xenodiagnosis, 73 (72,3%) were positive to *T. cruzi*, corresponding to 57 out 78 (73,1%) patients. In 51 out 57 (89,5%) patients (26 coinfectad and 31 chronic Chagas(disease) with positive xenodiagnosis the isolation of *T. cruzi* were possible by the use of xenoculture. *T. cruzi* isolation was obtained in 25 out 26 (96,2%) coinfectad patients and 26 out 31 (83,9%) between seronegatives. From 461 triatomines that were infected in xenodiagnosis "in vivo" or "in vitro" it were possible the isolation of 250 (54,2%) samples of *T. cruzi*. From 399 bugs, negatives at xenodiagnosis, we isolated, by xenoculture 25 (6,3%) *T. cruzi*. Among 22 dead nymphs, for which we can't examine in xenodiagnosis, xenoculture viabilized isolation of 2 (9,1%) samples of *T. cruzi*. From no one negative xenodiagnosis it were isolated *T. cruzi*. We observed 5% of loss of xenocultures by fungic or bacterial contamination. We observed, also, an apparent better adaptation of slender forms to the culture medium. Besides to possibilite *T. cruzi* isolation from around 90% of patients with positive xenodiagnosis and from more than half of infected triatomines, the xenoculture viabilized recognition and parasite isolation from around 13,3% (27/203) of insects that were dead or identified as negative when examined in positive xenodiagnosis.

DESCRIPTORS: *Trypanosoma cruzi*; Chagas' disease; coinfection *T. cruzi* /HIV; isolation; "xenoculture"; AIDS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, RDR; FERNANDES, LAR; FUNAYAMA, GK; FERRIOLI Fº, F. & SIQUEIRA, AF — Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes dead com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev.Inst.Med.Trop.* S. Paulo, **14**:1-5, 1972.
2. ALMEIDA, SP; SHERLOCK, IA & FAHEL, E — Novo procedimento de xenodiagnóstico na forma crônica da doença de Chagas. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de janeiro, **74**: 285-288, 1976.
3. BRENER, Z — O Parasito: Relações Hospedeiro-Parasito. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z — *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979 p.1-41
4. BRUMPT, E — Le xéodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. *Bull.Soc.Path.Exot.*, **7**:706-710,1914.
5. CAMARGO, ME & TAKEDA, G.K.F. — Diagnóstico de laboratório. In: BRENER, Z & ANDRADE, ZA- *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Ed. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 1979. p. 175-198.
6. CERISOLA, JA; ROHWEDDER, R; SEGURA, EL; DEL PRADO, CE; ALVAREZ, M & DE MARTINI, GJW — *El xenodiagnóstico*. Institute Nacional de Diagnóstico e Investigación de la enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, 1974.
7. CHIARI, E & DIAS, JCP — Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev.Inst.Med.Trop.* S.Paulo, **8**: 134-138, 1966.
8. CHIARI, E & DIAS, JCP — Nota sobre nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, **9**: 133-136, 1975.
9. FISCHER, RA & YATES, F — *Tabelas estatísticas: para pesquisa em Biologia, Medicinae Agricultura*. São Paulo, Universidade de São Paulo & Polígono, 1971. 150p.
10. FREITAS, JLP — *Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por proces-*

- sos de laboratório*. Tese. Fac. Med. Universidade de São Paulo, 1947. 160 p.
11. FREITAS, JLP — Observações sobre o tempo ótimo para o exame de triatomíneos empregados em xenodiagnósticos. *Folia clin.biol.*, 16: 180-185, 1950.
 12. GUEDES, MLS & GUEDES, JS — *Bioestatística para profissionais de Saúde*. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, 1988. 210p.
 13. GUILHERME, CS; NUNES, EV; OLIVEIRA Jr., OC; WESTPHALEN, SR; MAREI, SST; FERREIRA, MA & TOLEZANO, JE — Evaluation of parasitemia by *Trypanosoma cruzi* in the experimental infection of *Triatoma infestans* breeding in different rhythm of feeding. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 92(Suppl.I): 285, 1997.
 14. MAEKELT, GA — A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas disease. *Amer.J. Trop.Med.Hyg.*, 13: 11-15, 1964.
 15. MINTER-GOEDBLOED, E; MINTER, DM & MARSCHAL, C — Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 72: 217-225, 1978.
 16. NUSSENZWEIG, V & SONNTAG, R — Xenodiagnóstico artificial. Novo processo. Primeiros resultados positivos. *Rev.paul.Med.*, 40: 41-43, 1952.
 17. OLIVEIRA Jr.,OC; NUNES, EV; RAMIREZ, LP; GUILHERME, CS; SHIKANAI-YASUDA, MA; SARTORI, AM; WESTPHALEN, SR & TOLEZANO, JE — Xenodiagnosis for diagnostic and parasitemic evaluation in the *Trypanosoma cruzi*/HIV coinfection. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 92 (Suppl. I): 286, 1997.
 18. PEREIRA, JB, WILLCOX, HPF; MARCONDES, CB & COURA, JR — Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. *Rev. Soc. Bras.Med.Trop.*, 22: 39-44, 1989.
 19. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A & MULLER, CA — Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas´disease. 1-Comparative xenodiagnosis with 9 triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 77: 37-53, 1982.
 20. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A & MULLER, CA — Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas´disease. 2- Attempts to upgrade the reliability and the efficacy of xenodiagnosis in chronic Chagas´disease. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 82: 259-272, 1987.
 21. RAMIREZ, LP; FERREIRA, MS; SARTORI, AM; NUNES, EV; BUGARELLI, ME; SHIKANAI-YASUDA, MA; LIMA, JN; CRUZ, A; OLIVEIRA Jr., OC; GUILHERME, CS; BARNABE, C; TIBAYRENC, M & TOLEZANO, JE — Xenodiagnosis in chronic Chagas´disease and coinfection with HIV in Brazil. 14TH International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Nagasaki, Japan, 1996. Abstracts p. 353.
 22. RASSI, A; AMATO NETO, V & OLIVEIRA, RL — Observações sobre a hemocultura em meio de LIT para *Trypanosoma cruzi* segundo Mourão e Mello (1975). *Rev.Inst.Med.Trop.* S. Paulo, 23: 57-60, 1981.
 23. SALGADO, AA — Consideraciones sobre metodologia y sensibilidad del xenodiagnóstico. *Bol. Chil.Parasit.*, 24: 9-13, 1969.
 24. SANTOS, AH; SILVA, IG & RASSI, A — A comparative study between natural and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas´disease patients. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, 28: 367-373, 1995.
 25. SARTORI, AM; SHIKANAI-YASUDA, MA; AMATO NETO, V & LOPES, MH. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infections and chronic Chagas´disease with reactivation of Chagas´disease causing cardiac disease in the three patients. *Clin.Infect.Dis.*, 26: 177-179, 1998.
 26. SCHENONE, H.; ALFANO, E; REYES, H & TAUCHER, E — Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crônica. *Bol.Chil.Parasit.*, 23: 149-154, 198.
 27. TOLEZANO, JE; ARAÚJO, MFL; RIBEIRO, SS & ISHIDA, MMI — Efeitos do jejum e da temperatura em laboratório na infecção de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 43: 25-32; 1983.
 28. TOLEZANO, JE; NUNES, EV & TANIGUCHI, HH — Sobrevivência de *Trypanosoma cruzi* em *Triatoma infestans* mortos por ação de inseticida. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 48: 5-6, 1988.

Recebido para publicação em 09/04/98