

ISSN 0073-9855

# REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

RIALA 6

VOLUME 58

NÚMERO 2

1999



*Letras & Letras*<sup>®</sup>

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## DIRETOR RESPONSÁVEL

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

## COMISSÃO DE REDAÇÃO

KIMIYO NONOYAMA, **Presidente**  
CLAYDES DE QUADROS ZAMBONI - **Membro emérito**  
ELIANI DE ARAÚJO  
MARIA ALICE DA SILVA TELLES  
MARIA LUISA BARBOSA  
MÔNICA ARCON BATISTIC  
NEUS SADOCCO PASCUET  
PEDRO LUIZ SILVA PINTO  
RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS  
REGINA M. MORELLI SILVA RODRIGUES  
THAÏS VALÉRIA MILANEZ, **Secretária**

## SETOR DE PUBLICAÇÕES

ROCELY A. SOUZA BUENO

---

## PRODUÇÃO

EDITORA LETRAS & LETRAS LTDA.

EDITOR

Carlos José Linardi

Endereço/ Address

Av. Ceci, 1945 – São Paulo

CEP 04065 – 003

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

e-mail: [letras@uol.com.br](mailto:letras@uol.com.br)

site: [www.letraseletras.com.br](http://www.letraseletras.com.br)

---

Por problemas técnicos esta revista foi impressa em maio de 2000 — retroativa a 1999.

Endereço/ Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 355  
01246 – 902 – São Paulo – SP  
(Caixa Postal, 1783 – CEP – 01059-970)  
e-mail: biblioteca@ial.sp.gov.br  
rialala@ial.sp.gov.br

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 — 1999  
1999, 58 (2)

ISSN 0073-9855

RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

---

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

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Todos os manuscritos devem ser em forma de artigos, comunicações científicas ou revisões, em português ou inglês preferencialmente, 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 em disquete 3 1/2, conforme instruções que serão enviadas após a aprovação.

O artigo científico deve ser elaborado com a seguinte estrutura:

**Página de rosto:** **a)** título do artigo; **b)** nome do(s) autor(es); **c)** filiação científica indicando o autor e endereço a quem deverá ser encaminhada a correspondência.

**Texto:** **a)** título: deve ser curto e específico em inglês e português, indicando precisamente o conteúdo; em título longo, recorrer a subtítulo; **b)** autores: nome e último sobrenome por extenso, e o último sobrenome em caixa alta (Ana Maria C. D. da SILVA); **c)** filiação científica indicada por número sobrescrito, e o autor e endereço a quem deverá ser encaminhada a correspondência indicada por asterisco (\*); **d)** resumo: deve ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não exceder 200 palavras; **e)** palavras-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo; **f)** introdução: deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis da pesquisa, definições, se necessárias, e discussão do problema à luz de bibliografia pertinente; **g)** material e métodos: claramente descritos e validados, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicitada; **h)** resultados: devem ser claros e concisos, tabelas e figuras devem ser usadas somente quando necessárias e devem ser auto explicativas; **i)** discussão: pode ser apresentada conjuntamente aos resultados; **j)** conclusões: em alguns casos podem ser incluídas no item discussão, sendo assim, não há necessidade de repeti-las em item à parte; **k)** agradecimentos: (se for o caso); **l)** title, abstract and key words: em inglês antecedendo as referências; **m)** referências.

A comunicação científica deve ser elaborada com a seguinte estrutura:

**Página de rosto:** como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Não dividi-lo, ou seja, introdução, métodos, dados experimentais e outros devem compor único texto. Incluir no máximo duas tabelas ou figuras ou uma tabela e uma figura e, no máximo, vinte referências. Os autores devem escrever na carta que acompanha o trabalho que se trata de uma comunicação científica.

O artigo de revisão deve apresentar:

**Página de rosto:** como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Deve ser dividido em seções com títulos e subtítulos apropriados. Os autores devem escrever na carta que acompanha o trabalho que se trata de um artigo de revisão.

**IMPORTANTE: os textos devem ser redigidos com processador de texto WORD for WINDOWS 6.0 ou compatível, espaço duplo, letra Times New Roman e tamanho de letra 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf)**

ABREVIATURAS - Devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS - Utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

TABELAS – Tabelas e figuras devem ser encaminhadas em folhas separadas. A localização aproximada destas deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

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 de 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”º: terão numeração única e seguida, em algarismos arábicos.

Todas as ilustrações devem ser identificadas com número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; devem 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 devem estar escritas fora da área de reprodução. As ilustrações coloridas estão sujeitas à confirmação.

REFERÊNCIAS : Devem ser mencionadas somente as de trabalhos consultados diretamente ligados ao assunto.

**No texto** – As referências serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, escritas em versal. Assim, para um autor: “TAUNAY<sup>31</sup> verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra e: “PEREIRA e MAIA<sup>19</sup>, pesquisando...”. para mais de dois autores usar *et al.* : “no trabalho de TSUNODA *et al.*”<sup>13,537</sup>; ou ainda... “Segundo vários autores<sup>13,537</sup>”.

**Observação: nomes científicos somente em itálico.**

As referências – terão numeração crescente e ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral). Todos os autores do artigo deverão ser citados.

**A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.**

Para artigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título completo do periódico sem abreviação e em itálico, nº do volume, páginas inicial e final, ano da publicação.

Exemplo:

Morley, A.; Trainor, K.; Blake, M. A. A primary stem-cell lesion in experimental chronic hypoplastic marrow failure. *Blood*, 45: 681-8, 1975.

Livro no todo

Último sobrenome do (s) autor (s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra, edição, imprensa ( local de publicação, editora e ano de publicação), descrição física ( nºs páginas ou volumes ), notas especiais.

Exemplo:

Naoum, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo, Sarvier, 1997. 171 p.

Capítulo de Livro

Último sobrenome do (s) autor (s) da parte referenciada, seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da parte referenciada, último sobrenome do (s)autor (s) da publicação (precedido por *In:* ), título da publicação, número da edição, local de publicação, editor, ano de publicação, página inicial e final da parte referenciada e/ou volume.

Exemplo:

Mansfield, J.M. Non pathogenic trypanosomes of mammals. *In:* Kreier, J.P., editor. *Parasitic protozoa I Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish*. New York, Academic Press, 1977. p.297-327.

Gomes, S. Informática e soberania. *In:* Benakouche, R.(org.). *A questão da informática no Brasil*. São Paulo, Brasiliense, 1985. p.30-36.

Dissertações e Teses

Silva, R.M. *ELISA-IgG em Estudos Epidemiológicos da Esquistossomose Mansônica em Área de Baixa Endemicidade: Comparação com RIF-IgM e o Método Parasitológico Kato-Katz*. São Paulo, 1998. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

Referência da Internet: último sobrenome do(s) autor(es) do “site” seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico (se for o caso), ( abreviado e itálico ), nome do “site” entre colchetes. Data da consulta no “site”.

Exemplo:

Trucksess, M.W.; Chou, J. P.; Young, K.; Page, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in barley, green coffee and roasted coffee. *FDA Science Forum Poster Abstract*. [http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/forum 97/97 A 30.html]. 5 maio 1997

## 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 de nota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator - secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

## DA DISTRIBUIÇÃO

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

ARTIGOS ORIGINAIS/ ORIGINAL ARTICLES

SUMÁRIO/CONTENTS

- 859 Avaliação bacteriológica dos recursos hídricos do município de Eldorado — Vale do Ribeira (SP)  
— Bacteriological evaluation of the water supplies of the Eldorado municipality — Vale do Ribeira (SP)  
José P.S.VALENTE, Carlos A.M. LOPES, Ana M.T.CAMINHAS & Antonia HORÁCIO ..... 9-13
- 860 *Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Sensibilidade ao Endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga.  
— *Drosophila Melanogaster* Meigen: 1. Susceptibility to Endosulfan and biomonitoring of Its residues in kale  
Garcia R. de ALMEIDA & Felix G. R. REYES ..... 15-24
- 861 Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre – RS  
— Qualitative evaluation of herbal medicines commercialized in Porto Alegre – RS ( Brazil)  
Tatiana ZUCCOLOTTO, Miriam APEL & Stela Maris Kuze RATES ..... 25-31
- 862 Incorporação experimental de *Vibrio cholerae* O1 não toxigênico em ostras (*Crassostrea brasiliensis*), vivas<sup>1</sup>  
— Experimental incorporation of *Vibrio cholerae* O1 non toxigenic in live oysters (*Crassostrea brasiliensis*)<sup>1</sup>  
Dilma Scala GELLI, Miyoko JAKABI, Ivany Rodrigues de MORAES & Nélida del MASTRO ..... 33-37
- 863 Avaliação da qualidade tecnológica de massa alimentícia seca à base de plasma bovino  
— Technological quality evaluation of dried plasma pasta.  
Alessandra E. V. G. da SILVEIRA, Leonor Almeida de SOUZA-SOARES & Eliana BADIALE-FURLONG..... 39-44
- 864 Verificação do estado de conservação e da utilização de sais de propionato em pães de forma  
Checking the state of conservation and use of propionic in loaf bread  
Gisélia CAMPOS, Maria de Fátima GOMIDES, Kleber Eduardo Silva BAPTISTA, Heloiza Maria de Oliveira Horta FRANKLIN, Rita Maria Lopes Portocarrero NAVEIRA, David Lee

	NELSON, Tânia Mara Amâncio Guerra Peixoto, Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA & Maria Berenice Cardoso Martins VIEIRA .....	45-52
865	Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional da hemoglobina S — Comparative study among the test solubility, the sickling and the gel-centrifugation for detection of the hemoglobin S. Marilena OSHIRO, Adelino POLI NETO, Karen MIGUITA, Cecília Ioshie WATANABE & Delma Lúcia Biancardi PALHARINI .....	53-56
866	Avaliação de método de Ogawa — Kudoh para o isolamento de micobactérias. — Evaluation of the Ogawa – Kudoh method for the isolation of micobacteria . Andréa G. V. COELHO, Liliana A. ZAMARIOLI, Marilice P. VICENTE & Regina Ruivo FERRO E SILVA .....	57-61
867	Determinação de açúcares em mel floral e mel de melato de algumas regiões de Minas Gerais e Santa Catarina — Sugar determination in floral honey and honeydew honey from regions of Minas Gerais and Santa Catarina Gisélia CAMPOS, Giancarlo Ubaldo NAPPI, Marcelo BASTOS, Maria de Fátima GOMIDES, Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA, Kleber Eduardo BATISTA, Regina Célia DELLA MODESTA .....	63-70
868	Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> em milho — Evaluation of analytical methods and optimization of conditions for the determination of fumonisins B <sub>1</sub> and B <sub>2</sub> in corn. Simone Magda CAMARGOS, Miguel MACHINSKI JUNIOR & Lucia M. VALENTE SOARES .....	71-79
869	Avaliação do teor de arsênio total em pescado de água doce — Evaluation of arsenic content in fish from freshwater Lúcio Flávio Costa MELO, Marcelo Antonio MORGANO & Dilza Maria Bassi MANTOVANI .....	81-86
870	Avaliação de métodos para determinação de Ocratoxina A em cafés verdes e torrados — Evaluation of methods for Ochratoxin A determination in green and roasted coffees. Regina Prado Zanes FURLANI, Lucia M. VALENTE SOARES, Paulo Lauro C. de OLIVEIRA .....	87-98
871	Comparação entre ELISA e cromatografia em camada delgada na quantificação de aflatoxinas em amendoim — Comparison between ELISA and thin layer chromatography in the quantification of aflatoxins in peanut Guilherme PRADO & Marize Silva de OLIVEIRA .....	99-104
872	Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona E em alimentos da região sul do Rio Grande Do Sul — Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in foods of Rio Grande do Sul, Brazil Eliana Badiale FURLONG, Leonor Almeida de Souza SOARES , Ana Paula VIEIRA & Geraldine DADALT .....	105-111
873	Estudo da variação do teor de nitritos e nitratos em embutidos coloniais: possíveis implicações para a saúde pública	

- 
- Studies of the Content Variability of Nitrites and Nitrates in Cottage Sausage: Possible Public Health Implications  
Marilena TURRA & Marco A. Záchin AYUB ..... 113-120
- 874 - Detecção de vírus Dengue Sorotipos 1 e 2 pela técnica de *Immno*blotting utilizando proteínas recombinantes.  
— Recombinant proteins for discriminating Dengue Virus Serotypes 1 and 2  
Maria Luisa BARBOSA, Júlia Maria M. Souzaa-FELIPPE, Benedito A. FONSECA, Peter N. MANSON, Juani J. B. FERREIRA & José Antonio JEREZ..... 121-127

## AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DOS RECURSOS HÍDRICOS DO MUNICÍPIO DE ELDORADO — VALE DO RIBEIRA (SP)

José P.S.VALENTE<sup>1</sup>  
Carlos A.M. LOPES<sup>2</sup>  
Ana M.T.CAMINHAS<sup>1</sup>  
Antonia HORÁCIO<sup>2</sup>

RIALA 06/859

VALENTE, J. P.S.; LOPES, C. A.M.; CAMINHAS, A. M.T. & HORÁCIO, A. — Avaliação bacteriológica dos recursos hídricos do município de Eldorado — Vale Do Ribeira (SP) — Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 9-13, 1999.

**RESUMO:** Foram coletadas 48 amostras de água provenientes de caixas d'água comunitárias, de torneiras localizadas em escolas e residências e de fontes, rios e poços, para a determinação do número mais provável de coliformes através do método dos tubos múltiplos. As amostras foram captadas em diferentes Bairros Rurais do Município de Eldorado pertencentes ao Parque Estadual Jacupiranga e apenas duas delas não demonstraram contaminação por coliformes. A densidade de coliformes nas amostras de água foi considerada elevada e associada à facilidade e rapidez com que a matéria de origem fecal humana e animal atinge os recursos hídricos, bem como a práticas agrícolas inadequadas, falta de mata ciliar, monocultura de banana nas montanhas e bordas dos rios, clima chuvoso, pobreza, baixa qualidade de vida e nível educacional da população.

**DESCRITORES:** Coliformes, Contaminação, Recursos Hídricos, Bacia do Rio Ribeira, Eldorado-SP

### INTRODUÇÃO

O Vale do Ribeira é a região mais pobre do Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 1990) com registro de alto índice de mortalidade infantil<sup>16</sup>. Área de proteção ambiental e reserva da biosfera, conforme decreto da UNESCO, localiza-se estrategicamente entre os grandes centros metropolitanos e industriais de São Paulo e Curitiba (Figura 1) e devido ao seu solo pobre, argiloso e impermeável, com características geológicas de montanha não obteve o desenvolvimento esperado. Por outro

lado, constitui região aurífera, rica em minérios, fato que tem despertado interesse de grandes grupos econômicos.

A bacia do Rio Ribeira ( e do Iguape\*) distribui-se em área de 8.350 dos 13.000 Km<sup>2</sup> de Mata Atlântica no Estado de São Paulo, sendo delimitada ao Norte e a Leste pelas bacias dos Rios Tietê e Paranapanema e ao Sul pela bacia do Rio Iguaçu no Estado do Paraná. Caracteriza-se ainda no mais rico recurso hídrico estadual com disponibilidade de água que, mesmo em épocas de grandes estiagens, conta com manancial 170 vezes maior do que a demanda regional. Além desses

1. Departamento de Química — Instituto de Biociências — UNESP — CEP 18618-000 — Botucatu -SP — C.P. 510

2. Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biociências — UNESP — Botucatu -  
C.P. 510 — CEP 18618-000 — Botucatu — SP  
E.mail .dept Microimuno @ laser com.br



FIGURA-1 — Localização da Bacia do rio Ribeira (do Iguape) (SÃO PAULO, 1989a)

aspectos, abriga em seu interior dois parques estaduais e conforme relatórios da CETESB<sup>6,7</sup>, apresenta contaminação por coliformes e poluição por metais pesados em seus recursos hídricos devido ao grande número de mineradoras em atuação, principalmente nos Municípios de Registro, Pariquera-Açu e Eldorado<sup>5,14</sup>.

Nesse sentido, a contaminação por coliformes no Vale do Ribeira foi inicialmente conhecida a partir de levantamento técnico realizado pela CETESB<sup>6</sup>, onde a entidade analisando as condições de abastecimento e de saneamento em 49 escolas rurais situadas nos Municípios de Registro Pariquera-Açu e Eldorado, observou que as amostras de água não obedeciam aos padrões de potabilidade estabelecidos pelas normas técnicas da entidade. As escolas em referência, todas abastecidas por poços artesianos, geralmente próximos a fossas e latrinas, tinham nessas condições a explicação prática para a baixa qualidade higiênico-sanitária da água utilizada para o consumo público.

Por outro lado, MARTINS<sup>11</sup> em estudo realizado na Fazenda Intervalas, reserva florestal localizada em Sete Barras, comunidade próxima de Eldorado, evidenciou que 80% da população representada por 150 habitantes sofriam de diarreia crônica ou de enfermidades parasitárias atribuídas ao consumo de água proveniente de fontes próximas a latrinas e de cursos d'água contaminados por dejetos de origem humana e animal.

A situação social do Vale do Ribeira é ainda complexa e permeada por problemas fundiários e deficiências de infra-estrutura viária, de saúde, habitação, sanea-

mento básico e com restrito mercado de trabalho pelas limitações ao uso da terra por ser área de preservação ambiental<sup>5</sup>.

Diante desses aspectos, o presente trabalho objetiva avaliar o nível de contaminação por coliformes em amostras de água, provenientes de caixas d'água e torneiras de escolas, residências e estabelecimentos comerciais, bem como de rios, fontes e poços, localizados em vários bairros rurais do Município de Eldorado — São Paulo, principalmente aqueles abrangidos pelo Parque Estadual Jacupiranga.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostras

Foram colhidas em frascos previamente esterilizados, conforme padrões da American Public Health Association — APHA<sup>1</sup> e pela CETESB<sup>8</sup>, 48 amostras de água provenientes de diferentes bairros rurais do Município de Eldorado, com a seguinte origem: Anta Gorda (N = 2), Batatal (N = 1), Arreadinho (N = 2), Arreado (N = 1), Martins (N = 3), Hilário (N = 1), André Lopes (N = 8), Ivaporunduva (N = 7), Abobral (N = 3), Sapatu (N = 4), Nhunguara (N = 7), Caverna do Diabo (N = 4), Quadro Vergueiro (N = 3), Rodovia Eldorado-Iporanga (N = 2). Os grupos amostrais provenientes das localidades acima mencionadas corresponderam a águas dos rios: Rio Assentado, Rio Batatal, Rio Cuvuvu, Rio da Caverna do Diabo, Rio Ribeira, Rio Bocó, Rio Nhunguara, Rio Formoso e Rio Trevo (N = 14), caixa d'água (N = 13), nascente (N = 7), poço (N = 2), bica (N = 2) e torneiras (N = 10). A origem das águas contidas em caixa e torneiras foi o de nascentes e cursos d'água localizadas em regiões altas e montanhosas, sendo sua captação procedidas através de mangueiras por ação da gravidade. Estas águas são captadas pela própria população e não contam com qualquer processo de tratamento. As amostras provenientes de rios foram coletadas diretamente do curso d'água durante o período agosto a novembro em condições climáticas favoráveis sem interferência de precipitação pluviométrica.

As amostras após a colheita foram enviadas ao laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu — UNESP, sob refrigeração, não excedendo o período de 8 horas para o início das análises.

(\*) O rio Ribeira passa a ser denominado de Ribeira do Iguape após receber contribuição do rio Juquiá, mantendo este nome até atingir o Oceano Atlântico. No entanto esta discriminação nem sempre é obedecida na literatura.

## 2. Determinação do número de coliformes

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes foi realizada segundo a técnica dos tubos múltiplos de acordo com as normas preconizadas pelo APHA — Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater<sup>1</sup> e pela CETESB<sup>2</sup>.

### 2.1. Determinação de coliformes totais

Para o teste presuntivo, a partir de cada amostra, foram preparadas diluições seriadas de ordem 10 ( $10^{-1}$  —  $10^{-8}$ ) e inoculado 1 mL de cada diluição em séries de tubos contendo caldo lactosado (CL — Merck), adicionados de púrpura de bromocresol. Após incubação a  $35 \pm 0,5$  C durante 24 — 48 h, a acidificação do CL com ou sem produção de gás revelou prova presuntiva positiva para a presença de bactérias do grupo coliforme.

No teste confirmativo, procurou-se transferir crescimento de cada cultura com resultado positivo para tubos contendo caldo lactosado adicionado de Verde Brillante e Bile a 2% (CLVBB- Merck), os quais foram incubados a  $35 \pm 0,5$ C, por 24 — 48 h. A turvação e a produção de gás caracterizaram a prova confirmativa positiva para as bactérias do grupo coliforme. O cálculo da densidade de coliformes foi expressa em NMP/ 100 mL, conforme estabelecido em tabelas específicas onde são fixados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

Relativamente ao teste completo, além dos resultados caracterizados nos testes presuntivos e confirmativos, procurou-se proceder o isolamento dos microrganismos com resultado positivo no CLVBB, em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM- Difco). Os microrganismos oriundos de colônias com características morfológicas típicas de coliformes foram submetidos ao teste de oxidase e corados pelo método de Gram. O resultado do teste completo foi considerado positivo, quando o microrganismo revelou tratar-se de bastonete Gram negativo não produtor de oxidase. O controle dos resultados da presença de coliformes totais foi realizado através de linhagem de *Klebsiella pneumoniae* ATCC n. 35657.

### 2.2. Determinação de coliformes fecais

Nessa determinação, transferiu-se de cada cultura com resultado presuntivo positivo em CLVBB crescimento para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC-Difco), os quais foram incubados durante  $24 \pm 2$  h a  $44,5 \pm 0,2$ C em banho-maria com agitação e temperatura constante. O resultado foi considerado positivo quando houve produção de gás nos tubos de EC. O controle dos

resultados da presença de coliformes fecais foi realizado através de linhagem de *Escherichia coli* ATCC n. 25922

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam elevada contaminação de coliformes ( $10^2$  —  $10^4$ ) na maioria das amostras (Tabela 1), sendo possível a caracterização de coliformes fecais em nove das quatorze localidades estudadas. A densidade máxima de coliformes fecais foi observada no bairro de Arreadinho ( $1,5 \times 10^4$  col/ 100 mL), verificando-se contudo, que apenas as amostras do bairro rural Hilário não revelaram esse tipo de contaminação no momento da pesquisa.

Contudo, considerando-se os diferentes tipos amostrais (Tabela 2), observa-se que a água proveniente dos rios e de poços artesianos da região, apresenta maior frequência de contaminação por coliformes fecais em relação aos demais grupos amostrais, fato possivelmente resultante do tipo solo da região, ausência de saneamento básico e de hábitos pessoais que concorrem para eliminação direta de matéria fecal a esse tipo de recurso hídrico.

A análise das amostras provenientes de torneiras, não obstante todo sistema domiciliar do Município de Eldorado seja abastecido por água de rio e de poços artesianos, não houve a constatação da presença de coliformes fecais dessas amostras, fato de difícil explicação, uma vez que as informações obtidas no local não indicaram qualquer tratamento prévio, que pudesse estabelecer controle sobre a contaminação desses microrganismos.

De um modo geral, o baixo nível sócio-econômico-educacional e higiênico-sanitário da população<sup>3</sup>, associados às características geológicas da região e a fatores como o tipo de solo, ausência de mata ciliar, monocultura de banana nas encostas e margens dos rios<sup>(1,3)</sup> têm conduzido a uma renovação rápida e constante da contaminação por matéria fecal, a qual é ainda frequentemente agravada pelo alto índice pluviométrico, que provoca erosão e maior nível de carreamento de partículas sólidas para os recursos hídricos do fundo do vale<sup>7</sup>.

Em conclusão, através dos resultados alcançados na presente investigação e de dados bibliográficos específicos sobre os riscos da contaminação ambiental por coliformes<sup>2,3,9,10</sup>, sugere-se investigação mais ampla no sentido de serem caracterizados microrganismos patogênicos, tendo em vista a elevada probabilidade epidemiológica de ocorrência de surtos de febres entéricas, diarreias infecciosas e de hepatite virótica nos habitantes do Município de Eldorado — Vale do Ribeira.

Tabela 1. Densidade de coliformes em 48 amostras de água provenientes de bairros rurais de Eldorado-SP

LOCAL (n de amostras)	COL. TOTAIS		COL FECAIS	
	Nº min.	Nº max.	Nº min.	Nº max.
Anta Gorda (2)	$4 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$	$4 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$
Batatal (1)	$8 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$	-	$9,3 \times 10^2$ *
Arreadinho (2)	$2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Arreado (1)	$1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	-	$1,1 \times 10^3$ *
Martins (3)	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^4$	-	-
Hilário (1)	0	0	-	-
Andre Lopes (8)	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	-	$4 \times 10^2$ *
Ivaporunduva(7)	-	$1 \times 10^{2*}$	$10^1$	$1 \times 10^2$
Abobral (3)	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	-	-
Sapatu (4)	$4 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	-	-
Nhanguara (7)	$9 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	-	$9 \times 10^1$ * *
Caverna do Diabo (4)	$10^1$	$1 \times 10^3$	-	$10^{1**}$
Quadro Vergueiro (3)	-	$1 \times 10^2$ *	-	$1 \times 10^2$ * *
Rodovia Eldorado-Iporanga (2)	-	$1 \times 10^2$ *	-	-

\* Determinação única

\*\* Resultado único

Tabela 2. Número de amostras de água contaminadas por coliformes fecais, conforme a origem de captação em bairros rurais do Município de Eldorado — SP

ORIGEM DAS AMOSTRAS (nº.)	N de amostras +/ n de amostras testadas (%)
RIO	7 / 14
CAIXA D' ÁGUA	2 / 13
NASCENTE	1 / 7
POÇO	2 / 2
BICA	0 / 2
TORNEIRA	0 / 10
TOTAL	12 / 48 (25 %)

RIALA 06/859

VALENTE, J. P.S.; LOPES, C. A.M.; CAMINHAS, A. M.T. & HORÁCIO, A. — bacteriological evaluation of the water supplies of the Eldorado municipality — Vale do Ribeira (SP) — Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 1999.

ABSTRACT: 48 water samples from community water boxes of schools, houses, shops and faucets, forest springs, rivers and wells, were taken for the coliform most probable number determination by using the multiple tubes method. The samples were obtained from several rural districts of the Jacupiranga State Park (Eldorado Municipality-SP), only two of them did not show coliform contamination. The density of coliforms in the water samples was considered high and associated with the facility and speed of the human and animal fecal matters to reach the hydrous resources, as well as, the agricultural malpractices, lack of ciliar forest, banana monoculture on the hills and edges of rivers, rainy weather, poverty, poor quality of life and low educational level of the population.

KEY WORDS: Coliforms, contamination, Hydrous resources, Eldorado, SP — Vale do Ribeira

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Standard Methods for the examination for water e wastewater, 18 th ed 1992.
2. BATTALHA, BEN-HUR L. E PARLATORE, A. C. Controle da Qualidade da Água para Consumo Humano — Bases Conceituais e Operacionais. São Paulo: CETESB, 1977. 198p.
3. BRANCO, SAMUEL MURGEL — Poluição: A Morte de Nossos Rios, 2a. ed. São Paulo: ASCE-TESP. 1983. 166 p.
4. \_\_\_\_\_ Hidrologia Aplicada à Engenharia Sanitária. São Paulo: CETESB/ ASCETESB. 1986. 616 p
5. CESP (Companhia Energética de São Paulo). Aproveitamento Hidroelétrico do Rio Ribeira UHE Funil — Relatório de Impacto Ambiental. São Paulo: CESP. 1992.
6. CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório Preliminar: Pariquera- Açú — Vale do Ribeira. São Paulo: CETESB. 1986.
7. \_\_\_\_\_. Avaliação da Qualidade Ambiental do Rio Ribeira de Iguape. São Paulo: CETESB. 1991.
8. \_\_\_\_\_. Técnicas de análises bacteriológicas da água: tubos múltiplos. São Paulo: CETESB, 1992, 130 p.
9. DERISIO, J. C. Introdução ao Controle de Poluição Ambiental. São Paulo: CETESB, 1992, 210 p.
10. ESREY, S.A. *et al.* Health benefits from improvements in water supply and sanitation: survey and analysis of the literature on selected diseases. Washington, DC, AID, 1990.
11. MARTINS, MARIA T. Agua limpa para todos. El CIID Informa. 22(1): 19-22, 1994.
12. PORTO, R. A. L. Hidrologia Ambiental. São Paulo: Ed. da USP. 1991, 411 p. (Coleção ABRH de Recursos Hídricos; v. 3)
13. SÃO PAULO (ESTADO) SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. Programa de Educação Ambiental do Vale Ribeira: Os Recursos Hídricos da Bacia do Rio Ribeira de Iguape e do Litoral Sul. v.4. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. 1989a. 35p.
14. \_\_\_\_\_. Programa de Educação Ambiental do Vale Ribeira: Poluição v.6. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. 1989b. 35p
15. \_\_\_\_\_. Secretaria De Economia e Planejamento. Programa de Ação Comunitária Integrada do Vale do Ribeira. São Paulo: Coordenadoria de Ação Regional. 1990. 95p.
16. SEADE. Perfil Municipal v. 2 1980-91. São Paulo: SEADE, 1993 (Regiões Administrativas de Registro. Santos e S. José dos Campos)

Recebido para publicação em 22/09/1997

*Drosophila melanogaster* MEIGEN: 1. SENSIBILIDADE AO ENDOSULFAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA

Garcia R. de ALMEIDA<sup>1</sup>  
Felix G. R. REYES<sup>2</sup>

RIALA 06/860

ALMEIDA, G.R. de & REYES, F.G. R — *Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Sensibilidade ao endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga — Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 15-24, 1999

**RESUMO:** A sensibilidade das moscas *Drosophila melanogaster* ao endosulfan e o seu uso no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em couve, foram avaliados. Nas condições do bioensaio, método do filme seco em placa de Petri, o endosulfan se degrada em função da temperatura, sendo mais rápida para o isômero alfa do que para o beta. Os bioensaios com *D. melanogaster* indicaram que a toxicidade do endosulfan aumenta com a temperatura (25 a 35 °C) e que as fêmeas são mais sensíveis ao inseticida. Os valores da  $CL_{50}$ , calculados em função da temperatura, variaram entre 4,2 e 11,7 µg/g pc para machos e 2,8 e 8,1 µg/g pc para fêmeas. Os resíduos de endosulfan em couve-manteiga foram determinados pelo método de bioensaio, que apresentou um limite de quantificação da ordem de 0,1 mg/kg e reprodutibilidade com coeficiente de variação de 10 %. A validação do bioensaio por cromatografia a gás corrobora a viabilidade do emprego da *D. melanogaster* no monitoramento de resíduos de endosulfan em couve.

**DESCRIPTORIOS:** Bioensaio com *Drosophila melanogaster*,  $CL_{50}$ , resíduos de endosulfan em couve, validação de bioensaio.

## INTRODUÇÃO

Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexaidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido) é um inseticida fitossanitário, formado pelos estereoisômeros alfa- e beta- endosulfan em proporção aproximada de 7:3, respectivamente. Pertence ao grupo éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado<sup>10, 21, 39</sup>. Os produtos de degradação são seus análogos endosulfan sulfato, diol, éter, hidroxiéter e lactona<sup>9, 10, 26</sup>, formados através de reações de oxidação e hidrólise<sup>9, 12, 26</sup>, fotólise<sup>2, 32</sup> e biodegradação<sup>12, 25, 26</sup>.

No solo<sup>31, 34</sup> e em vegetais<sup>7, 11, 27, 38</sup> o isômero beta e o endosulfan sulfato têm-se mostrado mais estáveis do que o isômero alfa<sup>34</sup>, o que parece estar relacionado com as condições de umidade do solo e com a quantidade de inseticida aplicado<sup>31</sup>.

No Brasil, o endosulfan tem uso permitido apenas em culturas de algodão, cacau, café, soja e cana-de-açúcar. Entretanto, a presença dos seus resíduos por uso indevido, reportada em produtos agrícolas como batata<sup>21</sup>, cenoura<sup>38</sup>, couve<sup>38</sup>, couve-flor<sup>33</sup>, pepino<sup>38</sup>, tomate<sup>5, 21</sup> e morango<sup>29</sup>, justifica o desenvolvimento de metodologia

1. Centro Universitário Adventista de São Paulo — Faculdade Adventista de Ciências Exatas e Naturais — Caixa Postal 12630 — São Paulo, SP CEP 05858-001 — Tel (11) 5821-5000.

2. Faculdade de Engenharia de Alimentos — Universidade Estadual de Campinas — Caixa Postal 6121 — CEP 13081-970 — Campinas, SP, — Tel.: (019) — 788 7276 / 8653 / Fax: (019) — 788 7890 — E-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br — Apoio financeiro: CAPES

simples para monitoramento do endosulfan em culturas onde o seu emprego não é autorizado.

Bioensaio com a mosca *Drosophila melanogaster* tem sido usado por alguns pesquisadores como indicador de resíduos de agrotóxicos em alimentos<sup>3, 8, 30</sup> e da presença, no ambiente, de substâncias químicas com potencial mutagênico<sup>10</sup>. Cabe destacar que as drosófilas, além da sua elevada sensibilidade para detectar a presença de substâncias tóxicas, são insetos de fácil criação, manutenção e manipulação em condições de laboratório, facilitando a realização de bioensaios<sup>6, 37</sup>.

Com o propósito de detectar resíduos de inseticidas em quantidades que possam apresentar perigo à saúde humana torna-se necessário pesquisar e avaliar métodos alternativos de triagem que sejam satisfatórios, práticos e que reduzam significativamente os custos para o controle de qualidade de produtos alimentícios, especialmente os hortifrutigranjeiros, quanto à presença de agrotóxicos em geral e de inseticidas em particular<sup>1</sup>.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao endosulfan e a viabilidade da sua utilização no biomonitoramento dos resíduos desse inseticida em hortifrutigranjeiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Aparelhos

Cromatógrafo a gás Varian 3400, equipado com detector de captura de elétrons, fonte de <sup>63</sup>Ni; coluna megabore DB-1 (30 m de comprimento x 0,54 mm de diâmetro interno), acoplado a um integrador processador CG 300.

Evaporador rotativo a vácuo Tecnal 120.

Homogeneizador de tecidos Tecnal 102.

Pulverizador costal Jato (20 L) provido com bico tipo jato cônico para aplicação em alto volume.

### Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para análise de resíduos, Merck. Sulfato de sódio anidro e florissil foram aquecidos a 400 °C, durante 8 h; antes do uso a resina foi ativada em estufa a 120 °C. Cloreto de sódio foi lavado, previamente, com acetona. Como padrão analítico foi utilizado endosulfan (isômeros alfa-, beta- e endosulfan sulfato) Hoechst (99,0 %) e, para os experimentos, o produto comercial Thiodan CE.

### Criação das moscas *D. melanogaster*

As moscas *D. melanogaster*, usadas para a realização dos bioensaios, foram criadas em ambiente com tempe-

ratura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Toxicologia do Instituto Biológico de São Paulo.

O meio de cultura foi preparado conforme descrito por JOSEPH e KNOBEL<sup>19</sup>, com modificação no procedimento de esterilização, feito em microondas ao invés de autoclave. O meio, recém-preparado, foi distribuído em frascos de vidro transparente de boca larga (50 mL/frasco) e conservado em refrigerador até o momento do uso.

Drosófilas machos (15) e fêmeas (15) foram transferidas para os frascos de cultura e mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C. No oitavo dia, foram removidas dos frascos, remanescendo as larvas. Após 48 h do início da emergência, as novas moscas foram transferidas para um outro frasco de cultura, procedimento este que foi repetido a cada 48 h, para obtenção de novos lotes de moscas.

### Bioensaio

No bioensaio utilizou-se o método do filme seco<sup>20</sup> em placa de Petri (50 x 20 mm). O filme foi preparado pipetando-se, por placa, 0,1 mL de solução inseticida. Placas controle foram preparadas com 0,1 mL de acetona, solvente utilizado na preparação da solução inseticida. O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Para a alimentação das moscas durante o teste colocou-se, nas placas, cerca de 0,5 g do meio de cultura. Moscas com idade de 3 a 5 dias, contidas em um frasco de vidro, foram imobilizadas por resfriamento em ambiente a 10 °C, durante 5 min<sup>6</sup>, e, em seguida, distribuídas em um vidro de relógio revestido com papel-filtro mantido a uma temperatura de 5 °C. Nessas condições, as moscas, uma vez separadas por sexo pela observação do tamanho e das características do abdômen<sup>16, 30, 35</sup>, foram contadas e transferidas para as placas teste. Estas, cada uma com 20 moscas, machos ou fêmeas, foram colocadas em recipiente de vidro, contendo no fundo uma placa de Petri com água para manter a umidade do ambiente. O conjunto foi tampado e mantido em estufa a 20; 25; 30 e 35 °C.

Para avaliação da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) foi utilizada a formulação Thiodan CE, sendo que as concentrações de princípio ativo, alfa- e beta-endosulfan, nas soluções utilizadas variaram entre 1,00 e 2,07; 0,83 e 1,73; e, 0,42 e 0,73 µg/mL, para as temperaturas 20; 25; e, 30 e 35 °C, respectivamente. Alíquotas de 0,1 mL dessas soluções foram pipetadas nas placas de Petri.

### Estabilidade do endosulfan no bioensaio

A estabilidade do endosulfan foi avaliada nas condições do bioensaio aplicando-se na placa de Petri 0,1 mL de solução inseticida de concentração 1,2 µg/mL. Evaporado o solvente, as placas foram tampadas, coloca-

das em recipiente de vidro e mantidas a 20, 25, 30 e 35 °C. Após 6, 12 e 24 h da aplicação, o inseticida foi extraído das placas com n-hexano, transferido para um tubo concentrador e levado para volume final de 1,0 mL. O endosulfan foi determinado por cromatografia a gás, nas seguintes condições de trabalho: temperatura da coluna, 200 °C; do injetor, 220 °C e do detector, 300 °C; fluxo de N<sub>2</sub>, 20 mL/min.

#### Ensaio de campo

Couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) foi cultivada, segundo a boa prática agrícola, no campo experimental do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, São Paulo.

As mudas foram plantadas em outubro, com espaçamento de 1,0 x 0,5 m, num canteiro com aproximadamente 100 m<sup>2</sup> e pulverizadas com Thiodan CE após 50 dias do plantio. O produto diluído em água (1 : 2000) foi aplicado, com pulverizador costal, na dosagem de cerca de 440 g do ingrediente ativo por hectare de área cultivada. Amostras testemunha foram colhidas da mesma plantação, antes da aplicação do inseticida.

Amostras de couve foram analisadas após 3, 10 e 17 dias da pulverização. A amostragem foi aleatória, colhendo-se uma folha de cada planta selecionada, em diferentes pontos da área cultivada, no período entre 9:00 e 10:00 h (sempre depois da perda da umidade superficial das folhas). As amostras foram transportadas para o laboratório, imediatamente após a colheita, e analisadas.

#### Validação do bioensaio

Para a validação do método de bioensaio, extratos de amostras de couve pulverizada com Thiodan CE foram também analisados por cromatografia a gás conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

Na quantificação por cromatografia a gás os resíduos de endosulfan foram determinados conforme a metodologia proposta por LUKE et alii<sup>24</sup>, com as seguintes modificações: de uma amostra de couve homogeneizada, foram transferidos 20 g para um erlenmeyer (250 mL). Após a adição de 150 mL da mistura acetona — água bidestilada (2:1), a amostra foi triturada em homogeneizador de tecido e filtrada a vácuo em funil de Büchner, com papel-filtro Whatman nº 1. Ao filtrado, transferido para um funil de separação (500 mL), acrescentou-se 100 mL do sistema solvente n-hexano — diclorometano (1:1) e agitou-se vigorosamente por 2 min. Separou-se a fase orgânica e, a fase aquosa, transferida para outro funil de separação (250 mL) contendo 5,0 g de NaCl, foi agitada vigorosamente até a completa dissolução do NaCl, adicionando-se

a seguir, 50 mL de diclorometano. Após agitar por 2 minutos, a fase orgânica foi separada e juntada à da primeira extração. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. A fase orgânica total foi colocada em um balão de fundo redondo (500 mL), concentrada em evaporador rotatório à temperatura de 40 °C até cerca de 1 mL e, ressuspendida em 10 mL de n-hexano.

A limpeza do extrato foi realizada em uma coluna cromatográfica (200 x 10 mm) contendo 8 cm<sup>3</sup> de florissil e, no topo, cerca de 1 cm<sup>3</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, previamente condicionado com 10 mL de n-hexano. Após a adição de 5,0 mL do extrato, a coluna foi lavada com 20 mL de n-hexano e o resíduo eluído com 40 mL da mistura n-hexano — diclorometano (1:1) e mais 60 mL do sistema solvente n-hexano — diclorometano — acetonitrila (49,5 : 50 : 0,5). O eluato recolhido foi concentrado em evaporador rotatório à temperatura de 40 °C até quase à secura e transferido com 10 mL de n-hexano para um tubo concentrador graduado. O extrato foi seco com nitrogênio, o tubo lavado com n-hexano, seco novamente com nitrogênio, diluído a 1 mL com n-hexano e injetado no cromatógrafo a gás, nas condições de trabalho anteriormente estabelecidas.

Para avaliação da metodologia quanto à recuperação e sensibilidade, amostras de couve (20 g) livre do inseticida, foram adicionadas de 1 mL da solução padrão do inseticida nas concentrações de 0,5 e 1 µg/mL de alfa- e de beta- endosulfan, caracterizando fortificações de 0,025 e 0,05 mg/kg de amostra, respectivamente. A faixa de linearidade da resposta do detector do cromatógrafo foi estabelecida usando diluições de 0,005 a 0,20 µg/mL para o alfa- e beta- endosulfan e de 0,01 a 1,0 µg/mL para o endosulfan sulfato. De cada uma dessas soluções foram injetados, no cromatógrafo, 2 µL.

Para a quantificação dos resíduos de endosulfan por bioensaio, placa testemunha e as preparadas com diferentes alíquotas do extrato purificado na coluna de florissil (número de repetições para as diferentes alíquotas do extrato, n=3), foram mantidas a 30 °C, durante 24 h para que pudesse ser estimado o volume de extrato necessário para matar 50 % da população teste.

#### Cálculo da CL<sub>50</sub>

Na avaliação da CL<sub>50</sub> levou-se em consideração as moscas mortas e as moribundas, observadas no momento da contagem<sup>6</sup>. Os cálculos dos valores da CL<sub>50</sub> foram efetuados por análise de proibito<sup>17</sup>.

#### Análise estatística

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de TUKEY (P <

0,05) foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas, como, também, para as temperaturas consideradas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se um software estatístico S.A.S.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade dos inseticidas depende da temperatura de exposição e de outros fatores como sua formulação, concentração, método de administração, espécie e período de desenvolvimento do inseto<sup>14</sup>.

Os valores de  $CL_{50}$  para as moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da variação da temperatura, são apresentados na Tabela 1. Os dados mostram que as drosófilas fêmeas são mais sensíveis ao inseticida, sendo que o valor da  $CL_{50}$  difere significativamente ( $P < 0,05$ ) entre machos e fêmeas para a mesma temperatura e, entre as diferentes temperaturas para um mesmo sexo. Verifica-se, ainda, que a 35 °C a sensibilidade ao endossulfan foi, aproximadamente, 3 vezes maior do que a 25 °C, o que pode ser devido a uma absorção mais rápida do inseticida com o aumento da temperatura. Esse comportamento é semelhante ao relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos<sup>13, 14, 15</sup>. Ainda, essa diferença na resposta foi sugerida como um artifício para aumentar a sensibilidade do bioensaio<sup>35</sup>.

Entretanto, para machos e fêmeas, o endossulfan apresentou toxicidade a 20 °C ligeiramente superior àquela apresentada a 25 °C, o que pode ser devido a maior tempo de residência das drosófilas no filme de endossulfan, como consequência de sua menor mobilidade na temperatura mais baixa. Comportamento semelhante, em relação à exposição ao DDT, foi observado para *M. domestica*<sup>36</sup> na faixa de 18 a 36 °C e na de 21 a 33 °C para larvas de grilo<sup>14</sup>.

O estudo da degradação do endossulfan em função do tempo de exposição e da variação de temperatura foi conduzido para avaliar a quantidade do inseticida que, durante os bioensaios estaria disponível, como isômero alfa e beta, já que estes e o metabólito endossulfan sulfato, são mais tóxicos para insetos do que os outros produtos de sua degradação<sup>4, 23</sup>. Os valores da percentagem residual do alfa- e beta- endossulfan remanescente na placa de Petri, após 6; 12 e 24 h nas temperaturas de 20; 25; 30 e 35 °C, são apresentados na Figura 2. Verifica-se que a degradação dos isômeros é proporcional ao tempo de exposição e à variação da temperatura e que o alfa-endossulfan se degrada mais rapidamente do que o beta. Após 24 h, a concentração do isômero alfa cai para valo-

res 2 a 3 vezes menores que a do beta. Resultados semelhantes foram relatados por BEARD & WARE<sup>7</sup>.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para detecção dos resíduos do endossulfan em couve foram conduzidos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Assim, diferentes volumes do extrato obtido, após purificação em coluna de florissil, foram usados para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50 % da população teste. A massa de endossulfan contida nesse volume (Tabela 2), relacionada àquela correspondente à  $CL_{50}$  a 30 °C (Tabela 1) permitiu estimar o nível de resíduo de endossulfan na couve (Figura 3).

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os valores do limite máximo de resíduo (LMR) estabelecidos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg<sup>3, 30</sup>. O limite de quantificação encontrado, para o método de bioensaio, foi da ordem de 0,1 mg de endossulfan/kg de amostra, para as drosófilas machos e fêmeas. Esse valor foi obtido considerando-se que, de 2 mL de um extrato purificado de couve (20 g), uma alíquota de 0,1 mL provocou a morte de 50 % da população teste. Ainda, três repetições na análise de uma mesma amostra de couve mostraram para o método de bioensaio um coeficiente de variação de 10 %, indicando uma boa reprodutibilidade, quando comparado aos de até 20 %, considerados aceitáveis na determinação de contaminantes traço<sup>18</sup>. Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao endossulfan e fortalecem a confiabilidade de sua utilização nos bioensaios com a finalidade de quantificar resíduos de inseticida em produtos agrícolas.

Para detectar a possível presença, na couve<sup>22</sup>, de substâncias naturais com ação inseticida que poderiam interferir nos resultados do bioensaio, amostras de extratos isentos de agrotóxicos foram avaliados pelo bioensaio. Todas as moscas sobreviveram ao teste, resultado que indica ausência ou a presença em níveis não-letais de substâncias tóxicas para esse inseto teste.

Com o intuito de validar o método biológico, os mesmos extratos utilizados no bioensaio foram analisados, quanto ao teor de endossulfan, por cromatografia a gás. Na Tabela 3 são apresentados os níveis de resíduo de alfa- e beta-endossulfan e endossulfan sulfato determinados na couve após períodos de 3, 10 e 17 dias da aplicação do inseticida e na Figura 3 o endossulfan total, assim determinado, é comparado àqueles valores obtidos pelo método de bioensaio. Verifica-se que não existe diferença significativa entre os dois métodos, a um nível de confiança de 0,05.

Cabe ressaltar, como pode ser observado na Figura 3, que mesmo após 17 dias da aplicação, resíduos de endo-

Tabela 1. Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) do endossulfan (produto comercial Thiodan CE) para *D. melanogaster*, em função da temperatura.

Temp. (°C)	Machos	Fêmeas
	CL <sub>50</sub> ± s <sup>(a)</sup> (µg/g pc)	CL <sub>50</sub> ± s <sup>(a)</sup> (µg/g pc)
20	10,2 ± 0,7 (A, a) <sup>(b)</sup>	6,5 ± 0,5 (B, a)
25	11,7 ± 1,0 (A, b)	7,9 ± 0,6 (B, b)
30	8,7 ± 0,3 (A, c)	6,0 ± 0,1 (B, a)
35	4,3 ± 0,1 (A, d)	2,8 ± 0,2 (B, c)

<sup>(a)</sup> s = estimativa do desvio padrão absoluto.

<sup>(b)</sup> Comparação entre médias. As letras "A e B" indicam comparação de médias entre machos e fêmeas para uma mesma temperatura e as letras "a, b, c, d" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias com mesma letra não são significativamente diferentes (P < 0,05).

Tabela 2. Massa de endossulfan aplicado nas placas de Petri que correspondem aos valores de CL<sub>50</sub> das moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Machos (µg/placa)	Fêmeas (µg/placa)
20	0,14	0,14
25	0,16	0,17
30	0,12	0,13
35	0,06	0,06

Tabela 3. Resíduos de alfa-, beta-endossulfan e endossulfan sulfato determinados em couve, por cromatografia a gás, após diferentes períodos da aplicação de Thiodan CE (440 g i.a./ha)

Período após aplicação (dias)	Endossulfan (mg/kg)		
	Alfa	Beta	Sulfato
3	0,474	0,513	0,276
10	0,034	0,030	0,390
17	0,011	0,011	0,196

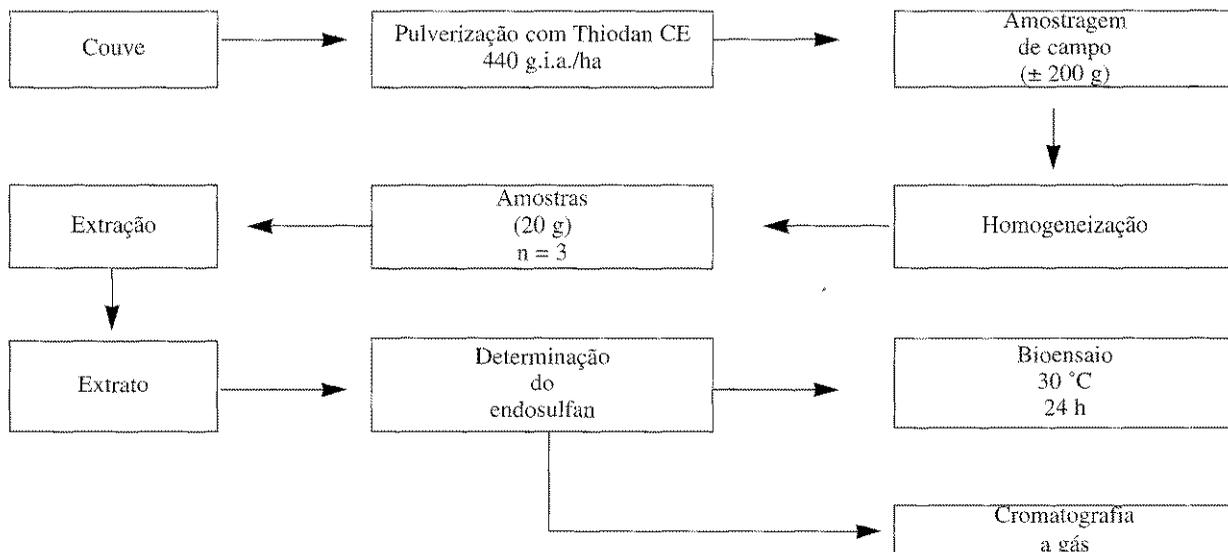


Figura 1 — Fluxograma do procedimento experimental utilizado na validação do bioensaio na determinação de endossulfan em couve.

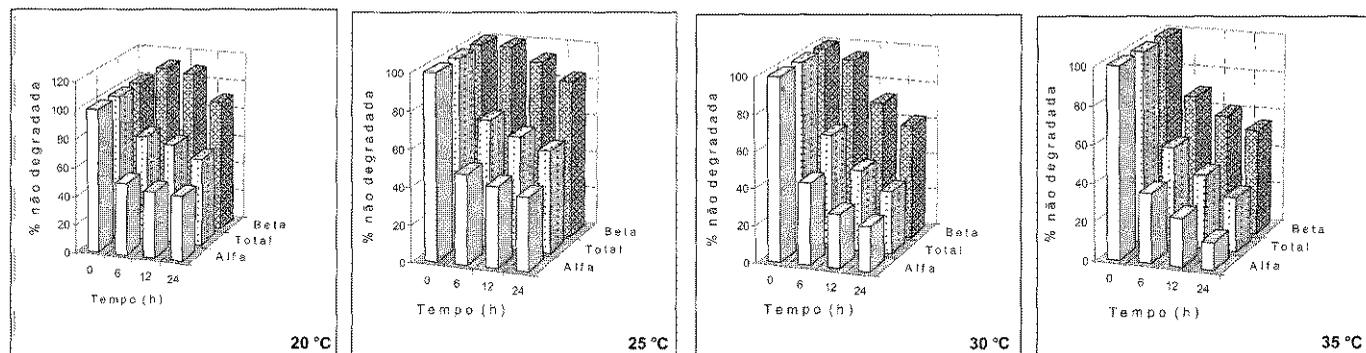


Figura 2 — Percentagem residual, em placa de Petri, de alfa e beta-endossulfan e endossulfan total (alfa + beta), em função da temperatura, para 0,12 µg do inseticida nas placas.

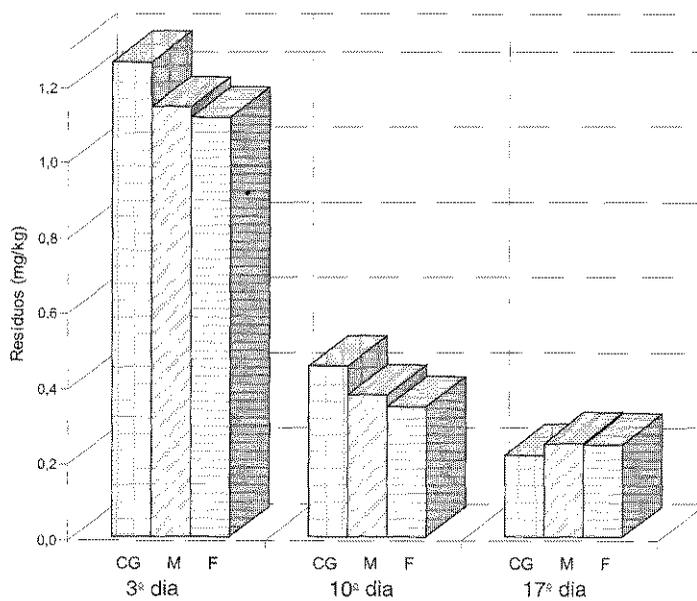


Figura 3 — Resíduos de endossulfan aplicado em couve, determinado por cromatografia a gás (CG) e por bioensaio com *D. melanogaster* machos (M) e fêmeas (F), após diversos períodos da aplicação do inseticida.

sulfan foram detectados na couve em níveis de 0,2 mg/kg, o que sugere lenta degradação do inseticida, justificando o seu monitoramento nessa matriz.

Na determinação por cromatografia a gás, os valores de recuperação do endosulfan nas amostras de couve fortificadas com teores de inseticida de 0,025 e 0,05 mg/kg foram, respectivamente, 104 e 90 % para o alfa-endosulfan e, 85 e 96 % para o beta-endosulfan (média de três determinações; coeficiente de variação entre 4 e 11%). Esses valores de recuperação encontram-se dentro da faixa 80 — 120 % aceita internacionalmente<sup>18</sup>. O limite de detecção do instrumento, considerando relação sinal-ruído da linha base igual a 3:1, foi de 20 pg para endosulfan alfa- e beta- e 100 pg para endosulfan sulfato. O limite de quantificação do método foi de 4 µg/kg de amostra para endosulfan alfa- e beta- e 20 µg/kg para endosulfan sulfato. Esses valores de recuperação e limite de quantificação indicam que as modificações introduzidas no método de Luke et alii<sup>24</sup>, não afetaram a sua confiabilidade e aplicabilidade.

Embora os métodos cromatográficos sejam de grande sensibilidade, a utilização destes, do ponto de vista econômico, é limitada para o monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos, especialmente nos países emergentes, devido aos custos elevados de equipamentos e reagentes. Ainda, nesses países, inseticidas e outros praguicidas frequentemente são usados em culturas para as quais não são autorizados e/ou de modo excessivo e

indiscriminado o que pode resultar em resíduos acima dos níveis permitidos em alimentos.

Comparado ao método de cromatografia a gás o de bioensaio apresenta, além de baixo custo e simplicidade de execução, adequado limite de quantificação e boa reprodutibilidade, qualidades necessárias para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

## CONCLUSÕES

As moscas *Drosophila melanogaster* Meigen apresentam, através de bioensaio pelo método do filme seco, elevada sensibilidade ao endosulfan e para detecção de resíduos desse inseticida em couve, o que indica a viabilidade da sua utilização para o monitoramento de resíduos de endosulfan nessa hortaliça.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Flavio R. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster*, à Hoechst pela doação dos padrões analíticos e a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) pela doação do Thiodan CE. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudo recebida e ao Instituto Adventista de Ensino, Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

RIALA 06/860

ALMEIDA, G.R. de & REYES, F.G. R — *Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Susceptibility to Endosulfan and biomonitoring of Its residues in kale — Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 15-24, 1999

**ABSTRACT:** The susceptibility of flies *Drosophila melanogaster* to endosulfan and the use of this organism in biomonitoring residues of the insecticide in kale was evaluated. In the condition of the bioassay, residues-film bioassay in the Petri dish, endosulfan degraded depending on the temperature and alpha isomer degrades faster than beta isomer. Bioassays conducted with *D. melanogaster* showed that the toxicity of the insecticide increases with the temperature (25 to 35 °C) and that the females are more susceptible to the insecticide. LC<sub>50</sub> values calculated as a function of temperature, varied from 4.2 to 11.7 µg/g bw for the males and 2.8 to 8.1 µg/g bw for the females. The formulated product Thiodan CE was applied on kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the residues of endosulfan were determined by bioassay. The determination limit by bioassay is in the order of 0.1 mg/kg and the method presented a reproducibility with a coefficient of variation of 10%. The validation of the bioassay by gas chromatography confirm the viability of the bioassay with *D. melanogaster* in monitoring the residues of endosulfan in kale.

**KEY WORDS:** Bioassay with *Drosophila melanogaster*, LC<sub>50</sub>, endosulfan residues in kale, bioassay validation

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, W. F. *Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. 54p.
2. ARCHER, T. E. Endossulfan residues on alfalfa hay exposed to drying by sunlight, ultraviolet light and air. *Pestic. Sci.* 4: 59 — 68, 1973.
3. BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; UNGARRO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & GAETA, R. Ensaios biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.* 1: 3 — 5, Jan. 1988 e Jul. 1988.
4. BARNES W. W. & WARE G. W. The absorption and metabolism of C<sup>14</sup>-labeled endossulfan in house fly. *J. Econ. Entomol.* 58: 286 — 291, 1965.
5. BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N. K.; LEMES, V. R. R. KUSSUMI, T. A.; SCORSAFAVA, M. A. & ROCHA, S. O. Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no Estado de São Paulo em 1994. *Pesticidas R. Téc. Cient.*, 6: 1 — 12, 1996.
6. BARTLETT, B. R. A new method for rearing *Drosophila* and a technique for testing insecticides with this insect. *J. Econ. Entomol.* 44(4): 621, 1951.
7. BEARD, J. E. & WARE, G. W. Fate and endossulfan on plants and grass. *J. Agric. Food Chem.* 17(2): 216 — 220, 1969.
8. CHIANG, T.; DEAN, M. C. & McDANIEL, C. S. A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorous insecticide residues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34(6) 809 — 814, 1985.
9. CHOPRA, N. M. & MAHFOUZ, A. M. Metabolism of endossulfan I, endossulfan II, and endossulfan sulfate in tobacco leaf. *J. Agric. Food Chem.* 25(1): 32 — 36, 1977.
10. GOEBEL, H. Chemical and physical properties of endossulfan and its degradation products. *Residue Reviews*, 83: 6 — 12, 1982.
11. GOPAL, M. & MUKHERJEE, I. Determination of residues of endossulfan and endossulfan sulfate on eggplant, mustard and chickpea. *Pestic. Sci.* 37(1): 67 — 72, 1993.
12. GREVE, P. A. & WIT, S. L. Endossulfan in the Rhine river. *J. Water Pollution Control Fed.* 43(12): 2338 — 2348, 1971.
13. GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.* 43(4): 559 — 560, 1950.
14. HARRIS, C. R. — Influence of temperature on the biological activity of insecticides in soil. *J. Econ. Entomol.* 64: 1044 — 1049, 1971.
15. HARRIS, C. R. & KINOSHITA, G. B. Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *J. Econ. Entomol.* 70(2): 215 — 218, 1977.
16. HENNEBERRY, T. J.; McGOVERN, W. L.; YEOMANS, A. H. & MASON, H. C. Sexing large numbers of *Drosophila melanogaster* adults by a size differential. *J. Econ. Entomol.* 57(5): 769 — 770, 1964.
17. HOFFMANN, R. Análise de probito com determinação da dose letal mediana — Programa probito. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP, Piracicaba, SP, Maio de 1990.
18. HORWITZ, W.; KAMPS, L. R. & BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 1344 — 1354, 1980.
19. JOSEPH Jr, H. & KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 40(1): 43-47, 1980.
20. LAUG, E. P. A biological assay method for determining 2,2 bis (p- chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). *J. Pharm. Exptl. Therap.* 86: 324 — 31, 1946.
21. LEMES, V. R. R.; INOMATA, O. N. K. & BARRETO, H. H. C. Resíduos de endossulfan em tubérculos e frutos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 53(1/2): 49-54, 1993.
22. LICHTENSTEIN, E. P., MORGAN, D. G. & MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.* 12(2): 158 — 161, 1964.
23. LINDQUIST, D. A. & DAHM, P. A. — Some chemical and biological experimental with thiodan. *J. Econ. Entomol.* 50: 483 — 6, 1957.
24. LUKE, M. A.; FROBERG, J. E. & MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58(5): 1020 — 1026, 1975.
25. MARTENS, R. Degradation of [8,9-<sup>14</sup>C]endossulfan by soil microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(6): 853 — 858, 1976.
26. MILES, J. R. W. & MOY, P. Degradation of endossulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 13 — 19, 1979.

27. MUKHERJEE, I. GOPAL, M. & YADURAJU, N. T. HCH, endossulfan, and fluvalinate residue behavior in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48(1): 163 — 70, 1992.
28. MUKHERJEE, I. M. & GOPAL, M. Interconversion of stereoisomers of endossulfan on chickpea crop under field conditions. *Pestic. Sci.* 40(2): 103 — 106, 1994.
29. OLIVEIRA, J. J. V. & TOLEDO, M. C. F. Resíduos de agrotóxicos em morangos. *Pesticidas R. Téc. Cient.* 5: 95 — 110, 1995.
30. PUGA, F. R.; RUBANO, S. — Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, W. F. (ed.) Métodos práticos para detección de resíduos de plaguicidas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. p. 37-43.
31. RAO, D. M. R. & MURTY, A. S. Persistence of endossulfan in soils. *J. Agric. Food Chem.* 28(6): 1099 — 1101, 1980.
32. SINGH, N. C.; DASGUPTA, T. P. ROBERTS, E. V. & MANSINGH, A. Dynamics of pesticides in tropical conditions. I. Kinetic studies of volatilization, hydrolysis, and photolysis of dieldrin and — and endossulfan. *J. Agric. Food Chem.* 39(3): 575 — 579, 1991.
33. SOARES, I. A. A.; GOULART, M. C. B.; QUEIROZ, R. L.; MELLO, S. M. M.; AZEVEDO, S. F. & ÁVILA, J. T. Levantamento de resíduos de inseticidas organoclorados e de malation e paration em frutas e hortaliças na CEASA/MG — 1983 — 1986. In: *XI encontro nacional de analistas de resíduos de pesticidas*. São Paulo, Junho, 03 a 05, 1987: relatório. São Paulo: Inst. Adolfo Lutz, São Paulo. 1987. p. 75 — 84.
34. STEWART, D. K. R. & CAIRNS, K. G. Endossulfan persistence in soil and uptake by potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* 22(6): 984 — 986, 1974.
35. STORER, I. T.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Zoologia Geral; Trad. de Ericka Schlenz e Francisco A. A. Sampaio. 6. Ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. 816p.
36. SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R. PANKASKIE, J. E. EARLE, N. W. & SUN, J. T. — Factors affecting residues-film bioassay of insecticide residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46(3): 530 — 542, 1963.
37. SUN, Y. P. & PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect, for the microbioassay of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.* 47(1): 180 — 181, 1954.
38. UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & BAGDONAS, M. Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutas e hortaliças (III). *Biológico*, São Paulo 53(7/12): 51 — 56, 1987.
39. World Health Organization (WHO/IPCS): Endossulfan. *Environmental Health Criteria* 40. Geneva, 1984. 62p.
40. ZIMMERLING, S. — Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. New York Acad. Sci.* 269: 26 — 33, 1975.

Recebido para publicação em 24/09/1997

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PRODUTOS FITOTERÁPICOS COMERCIALIZADOS EM PORTO ALEGRE — RS

Tatiana ZUCCOLOTTO\*  
Miriam APEL\*\*  
Stela Maris Kuze RATES\*\*\*

RIALA 06/861

ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M. & RATES, S.M.K. — Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre — RS — Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 25-31, 1999.

**RESUMO:** Este trabalho é uma avaliação qualitativa de produtos fitoterápicos e insumos vegetais comercializados em Porto Alegre no período de julho a outubro de 1997, com o objetivo de verificar as mudanças geradas na qualidade destes produtos após a vigência da Portaria nº 6 da SVS-MS (DOU 31/01/95). Foram analisados 42 produtos, adquiridos mediante compra em ervateiros, farmácias de manipulação e drogarias de Porto Alegre. As técnicas utilizadas foram baseadas na Farmacopéia Brasileira 4ª ed. e em literatura especializada ou desenvolvidas na disciplina de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia — UFRGS. Foram considerados como indicadores de qualidade: identidade, ausência de matérias orgânicas estranhas, estado de conservação e presença dos principais constituintes químicos das amostras em análise. Os resultados obtidos demonstraram que a vigência da Portaria nº 6 da SVS-MS (DOU 31/01/95) ainda não induziu uma alteração no quadro da qualidade dos produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, visto que das 42 amostras analisadas, 71,4 % não atendem aos quesitos mínimos de qualidade exigidos por esta norma, à semelhança de resultados obtidos em trabalhos anteriores.

**DESCRIPTORIOS:** fitoterápicos; análise da qualidade; Portaria nº 6 da SVS-MS — Brasil.

### INTRODUÇÃO

Estima-se que em 1997 as vendas mundiais de produtos fitoterápicos de venda livre (*over the counter*) alcançaram cifras de US\$ 10 bilhões de dólares, com previsão de um crescimento anual de 6,5%<sup>22</sup>. A OMS incluiu a fitoterapia em seus programas de saúde e instituiu pautas básicas para a validação de medicamentos de origem vegetal em países em desenvolvimento<sup>19,27</sup>. Países orientais, como a China e Índia, apresentam uma indústria de fitoterápicos

muito bem estabelecida e países da América Latina vêm investindo em programas de pesquisa em plantas medicinais e padronização e normatização de produtos fitoterápicos, a exemplo do que já vem ocorrendo há algum tempo em países europeus como França e Alemanha. Na Alemanha, 50% dos produtos fitoterápicos são vendidos com prescrição médica e ressarcidos pelo seguro de saúde<sup>11</sup>. Na América do Norte, onde até pouco tempo os produtos fitoterápicos eram comercializados como "health food"<sup>3</sup>, grupos de consumidores e profissionais têm buscado

\*Bolsista CNPq / Departamento de Genética — Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\*\*Bolsista CAPES/ CPG — Ciências Farmacêuticas — Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\*\*\*Professora Adjunta de Farmacognosia — Faculdade de Farmácia — Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\*\*\* Endereço para correspondência: Av. Ipiranga, 2752. CEP 90.610.000 — Porto Alegre (Brazil) — E-mail: Ratesmk@farmacia.ufrgs.br

uma alteração deste quadro, através da obtenção de informações sobre a eficácia e segurança destes produtos e um redirecionamento de seus registros é previsto pelo FDA<sup>12</sup>. Em 1997, o mercado norte-americano de produtos vegetais movimentou US\$ 2 bilhões de dólares<sup>3</sup>.

No Brasil, o mercado de fitoterápicos movimentou US\$ 40 bilhões ao ano<sup>4</sup>. No entanto, as indústrias de fitoterápicos são constituídas, basicamente, por empresas familiares de pequeno porte, muitas vezes funcionando precariamente, de forma empírica. Os projetos de pesquisa nessa área são desenvolvidos quase que unicamente nas Universidades, apoiados pela extinta Central de Medicamentos (CEME) e outras instituições estatais de fomento à pesquisa. A atividade é restrita a um número relativamente pequeno de estudantes de pós-graduação e alguns pesquisadores orientadores, na área de química e farmacologia de produtos naturais<sup>10</sup>, sem integração consistente com o setor empresarial, com raras exceções.

Conseqüentemente, a qualidade dos produtos comercializados muitas vezes não atende aos quesitos mínimos, mesmo considerando-se as ponderações da OMS<sup>19</sup> para produtos de uso tradicional, conforme pode ser observado na Tabela I. Os problemas mais freqüentes são a adulteração, a substituição, a não uniformidade da composição química, e, principalmente, a falta de comprovação científica das propriedades farmacológicas e indicações terapêuticas<sup>7, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 25</sup>.

Em 1995, a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS-MS), considerando a situação crítica em que se encontrava o mercado de fitoterápicos no Brasil, estabeleceu normas para o registro de fitoterápicos<sup>1</sup> e, posteriormente, publicou proposta de normas para o estudo de toxicidade destes produtos<sup>2</sup>. O atendimento das especificações destas Portarias garantiria a competitividade de nossa indústria e geraria um avanço considerável do conhecimento na área de produtos naturais como recursos terapêuticos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação da qualidade dos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre após a vigência da Portaria nº 6 SVS — MS, comparando-os com produtos vegetais com finalidade medicinal comercializados nas ruas por ervateiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Material

Foram analisadas 42 amostras, no período entre julho e outubro de 1997, com procedência assim distribuída: 7 amostras “in natura”, adquiridas em ervateiros, 17 fórmulas magistrais, adquiridas em farmácias de manipulação e 18 especialidades farmacêuticas, adquiri-

das em drogarias. Todos os produtos foram adquiridos na cidade de Porto Alegre-RS, mediante compra. As amostras foram escolhidas de acordo com a facilidade de compra e/ou pelo fato das plantas constituintes estarem inscritas na Farmacopéia Brasileira 4ª ed.<sup>9</sup>. Os produtos analisados apresentavam em sua composição uma única planta, sob a forma da droga inteira ou rasurada, a granel ou em sachets, ou nas formas farmacêuticas tintura, elixir e cápsula, em apresentações diversas. Os vegetais relatados como componentes eram: *Stictis brasiliense* (baicurú), *Peumus boldus* (boldo), *Centella asiatica* (centela), *Mikania glomerata* (guaco), *Pilocarpus jaborandi* (jaborandi) e *Valeriana officinalis* (valeriana).

### 2. Métodos

A análise foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo considerados os seguintes indicadores de qualidade: identidade, ausência de matérias orgânicas estranhas, estado de conservação e principais constituintes químicos.

A metodologia empregada compreendeu:

- identificação botânica sistemática;
- análise macroscópica: as amostras “in natura” foram observadas a olho nu e sob de lupa com aumento de 10 vezes<sup>17</sup>, para detecção de contaminantes diversos e determinação de matérias orgânicas estranhas, conforme Farmacopéia Brasileira 4ª ed.<sup>8</sup>;
- reações de identificação: foram realizadas reações de cor e precipitação de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª ed.<sup>9</sup> ou bibliografia especializada;
- análise cromatográfica: foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada analítica. Sempre que possível, foram utilizadas amostras vegetais com identidade comprovada para comparação do perfil cromatográfico e/ou amostras autênticas das substâncias ativas ou dos principais constituintes do vegetal em análise, como substâncias de referência<sup>9, 24, 26</sup>.

Todas as amostras foram divididas em duas porções, ao acaso: A e B. A porção B foi reservada para identificação botânica e análise macroscópica, quando possível, e confirmação dos resultados, se necessário.

Para as amostras “in natura” e na forma de cápsulas, a porção A foi triturada e levada à decocção, com solvente apropriado a cada caso, em banho-maria a aproximadamente 80°C, por 30 minutos. As soluções extrativas obtidas foram filtradas sobre algodão, concentradas em banho-maria, acondicionadas em frascos de vidro fechados e reservadas para análise cromatográfica e reações de identificação. As amostras de jaborandi e boldo foram extraídas, para obtenção de alcalóides totais, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª ed.<sup>9</sup>.

Tabela 1. sumo de trabalhos que apontam problemas na qualidade de produtos fitoterápicos comercializados no Brasil.

AUTORES	ANO/ LOCAL	PREPARAÇÕES OU SITUAÇÃO ESTUDADAS	PROBLEMAS/ GRAU DE REJEIÇÃO
Oliveira & Akisue <sup>18</sup>	1973 /SP	insumos vegetais	21 %
Schenkel <i>et al.</i> <sup>21</sup>	1986 / RS	48 insumos vegetais 17 preparações fitoterápicas	30 % 41 %
Mentz & Schenkel <sup>16</sup>	1989 / RS	Avaliação da informação contida em folhetos ou bulas dos produtos	Bulas inadequadas, falta de informações científicas
Marques, L. C. <sup>16</sup>	1992/ PR	Qualidade da matéria-prima	Dificuldades com fornecedores, identificação botânica e controle de qualidade deficiente
Marques & Bório <sup>15</sup>	1992 /PR	Avaliação da qualidade dos fitoterápicos no comércio (60 amostras)	100% de rejeição; problemas técnicos e legais
Rates <i>et al.</i> <sup>20</sup>	1993 / RS	51 amostras de ind. farmacêuticas 10 amostras de farmácias de manipulação 10 amostras de ervateiros	47 % 40 % 40 %

Tabela 2. resultado geral da análise da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre — RS (Jul-Out, 1998), considerando-se o número total de amostras e a procedência das mesmas

	AMOSTRAS ANALISADAS	AMOSTRAS APROVADAS	AMOSTRAS REJEITADAS	PERCENTUAL DE REJEIÇÃO (%)
Farmácias de Manipulação	17	05	12	70,6
Drogarias	18	07	11	61,1
Ervateiros	07	0	07	100,0
TOTAL	42	12	30	71,4

Tabela 3. Percentual das causas de rejeição da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre — RS (Jul-Out, 1998), considerando-se todas as análises.

CAUSAS DE REJEIÇÃO	PERCENTUAL (%)
Substituição do farmacógeno	19,0
Contaminação	31,0
Presença de produtos de degradação	2,4
Ausência do constituinte químico principal	57,1

Tabela 4. Percentual e causas de rejeição da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre — RS (Jul-Out, 1998), quanto à planta analisada.

PLANTA	NÚMERO AMOSTRAS ANALISADAS	PERCENTUAL DE REJEIÇÃO	PRINCIPAL CAUSA DE REJEIÇÃO
BAICURU	7	100%	Ausência dos constituintes químicos principais
BOLDO	7	42,8%	Contaminação
CENTELEA	6	66,6%	Ausência do constituinte químico principal
GUACO	9	77,8%	Ausência dos constituintes químicos principais
JABORANDI	7	57,1%	Ausência do constituinte químico principal
VALERIANA	6	83,3%	Ausência dos constituintes químicos principais

Para as amostras na forma de tinturas, elixires ou extratos, a porção A foi evaporada em banho-maria a 80 °C, retomada em 1 mL de metanol, acondicionada em frasco de vidro fechado e reservada para análise cromatográfica e reações de identificação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se o total das análises, o índice de rejeição foi de 71,4 %. Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados os dados absolutos e percentuais de rejeição, com relação à procedência das amostras e causas de rejeição, respectivamente.

Das 18 amostras provenientes de laboratórios industriais, e, portanto, atreladas diretamente à legislação, 11 não atenderam aos quesitos mínimos de qualidade exigidos por esta norma. As amostras provenientes de ervateiros apresentaram o maior índice de rejeição seguidas das provenientes de farmácias de manipulação e das provenientes de drogarias (laboratórios industriais). Porém, estas diferenças não são estatisticamente significativas, segundo a comparação 2x2 pelo teste exato de Fisher. Ou seja, os produtos manipulados sob responsabilidade técnica, ou comercializados sob registro no MS, não destacam-se em qualidade frente aos produtos populares vendidos por ervateiros, confirmando resultados obtidos em trabalhos anteriores. Isto, lamentavelmente, demonstra a pouca influência da presença do profissional farmacêutico e a inexistência de boas práticas de produção nos laboratórios industriais de fitoterápicos e farmácias de manipulação.

Os problemas mais encontrados foram as substituições, contaminações e ausência do constituinte químico principal. Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que entre as amostras que mais apresentaram problemas, destacam-se as de baicurú, produtos obtidos a partir das partes subterrâneas de *Statice brasiliense*, e de guaco, obtidas a partir das partes aéreas de *Mikania spp* e centela (*Centella asiatica*), sujeitas a exploração extrativista, com diferentes locais e épocas de coleta, e utilização da nomenclatura popular para aquisição e comercialização da matéria-prima. A influência ambiental na constituição química do vegetal e semelhanças morfológicas entre espécies distintas favorecem a diversidade química e substituições<sup>7,20</sup>. Por outro lado, o alto índice de ausência das substâncias ativas em espécies como *Valeriana officinalis*, importada, e *Pilocarpus spp*, com cultivo organizado, demonstram a inadequabilidade dos métodos de conservação e extração empregados.

Além da não observância de boas práticas de produção, a ausência de um controle de qualidade estruturado dentro dos laboratórios de produção e farmácias de manipulação contribuem para a baixa qualidade destes produtos. Isto confirma os dados obtidos pelo SEBRAE<sup>\*1</sup> sobre a necessidade de treinamento em qualidade.

Os dados obtidos levam à constatação de que a vigência da Portaria nº 6 da SVS-MS (DOU 31/01/95) não promoveu ainda alterações no quadro da qualidade dos produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre-RS, o que está em concordância com outro levantamento realizado por Dias (1997)<sup>6</sup>, em relação à qualidade da informação. Desta forma, parece-nos que, embora as plantas medicinais e suas formas derivadas constituam recursos terapêuticos passíveis de utilização na medicina científica, na prática a situação em nosso meio não permite euforia. Recentemente, foi lançada para consulta pública a Portaria nº 1.029 da SVS-MS (DOU 23/12/1998). Esta, se aprovada, revogará a Portaria nº 6, mantendo as mesmas exigências em relação aos parâmetros de qualidade botânicos e físico-químicos, mas apresentando diretrizes menos rígidas em relação a comprovação da eficácia e segurança de produtos fitoterápicos considerados de uso tradicional pela SVS. Contudo, alguns sinais de mudança começam a surgir. As indústrias, pressionadas pelas exigências legais ainda vigentes, estão se organizando e formando vários grupos com o objetivo de estudar e melhorar a qualidade de seus fitoterápicos e estabelecer espécies vegetais prioritárias para estudo científico. Listas de vegetais estão sendo formuladas e usadas na orientação de levantamentos bibliográficos, com vistas à obtenção de subsídios para inclusão na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira e seleção de vegetais para possível elaboração de um Formulário Nacional de Fitoterápicos<sup>5</sup>. Neste contexto, neste trabalho pode-se constatar ainda que os métodos de análise descritos na última edição da Farmacopéia Brasileira são compatíveis com a atual capacidade técnica dos laboratórios nacionais, não exigindo grande sofisticação de equipamentos.

Por outro lado, como resultado do Projeto de Plantas Medicinais da CEME, implantado em 1983, plantas nativas como *Maytenus illicifolia* e *Phyllanthus spp* emergem como perspectivas concretas para obtenção de medicamentos genuinamente nacionais. Alguns convênios escola-indústria vêm se consolidando com o apoio de agências de fomento ou fundações geridas pela própria indústria. Grupos de pesquisa relativamente bem desenvolvidos nas áreas de farmacologia pré-clínica e química de produtos naturais estão constituídos em várias regiões do país.

\*1 Levantamento realizado pela Faculdade de Farmácia (UFRGS) e SEBRAE, Porto Alegre, RS, 1995.

A ligação da indústria farmacêutica ao setor acadêmico emerge como uma estratégia promissora, pois as Universidades detêm o conhecimento do avanço científico na área, necessário para que a indústria, que já vende seus produtos num raio reduzido, possa expandir seu mercado e até mesmo entrar no meio externo<sup>4</sup>. Isto é particularmente relevante se considerarmos os acordos econômicos internacionais como ALCA e MERCOSUL.

Em conclusão, percebe-se que há a necessidade da estruturação de laboratórios de controle de qualidade na indústria e nas farmácias de manipulação, bem como investimentos no aperfeiçoamento do corpo técnico.

Além disso, para execução e cumprimento da legislação, a fim de garantir que estes produtos não percam a credibilidade e competitividade frente ao mercado consumidor, é necessário um programa rígido de fiscalização por parte da Vigilância Sanitária.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Marcos Sobral (CPG — Ciências Farmacêuticas) pela identificação botânica das amostras.

RIALA 06/86

ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M. & RATES, S.M.K. — Qualitative evaluation of herbal medicines commercialized in Porto Alegre — RS (Brazil). Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2) 1999.

**ABSTRACT:** This paper presents a qualitative evaluation of some herbal medicines commercialized in Porto Alegre — RS (Brazil) from July to October, 1997, in order to verify if the new Brazilian legislation about these products (Portaria 6 — SVS — MS — DOU 01.31.95) induced the improvement in their quality. Forty-two samples purchased from herbalists, drugstores and pharmacies were analysed considering botanical identity, absence of foreign organic materials, conservation state and presence of the main chemical compounds as quality indicators. The methods employed were based in the Farmacopéia Brasileira 4. ed and specialized literature. The results showed that the Portaria 6 — SVS — MS (DOU 01.31.95) validity has not yet influenced the quality state of herbal products commercialized in Porto Alegre, since 71,4 % of the analysed samples do not fit the minimum quality demands required by such legal rule. These results meet the ones observed in previous researchs in relation to the unsatisfactory quality of the Brazilian herbal medicines.

**KEY WORDS:** herbal medicines; quality control; phytopharmaceuticals; Brazilian herbal medicines; Brazilian phytopharmaceuticals; Portaria n 6 da SVS-MS-Brasil.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, v. 26, p. 1523-1524, 06 fev. 1995. Seção 1.
2. BRASIL. Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, v. 155, p. 15.199-15.200, 12 ago. 1996a. Seção 1.
3. BREVOORT, P. The current status of the U. S. botanical market. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997. *Abstracts*. Mendoza: ICMPA/ISHS/SAIPOA, 1997. P. L — 42.
4. CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência Hoje*, v. 21, n. 122, p. 26-30, 1996.
5. COMISSÃO DE HOMEOPATIA E FITOTERAPIA DO SINDUSFARM — SP. *Lista de plantas SINDUSFARM*. São Paulo: SINDUSFARM, 1995. p.9-13.
6. DIAS, T. *Produtos fitoterápicos à luz da legislação vigente e confiabilidade de suas indicações terapêuticas*. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Farmácia, 1997.
7. FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.
8. FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
9. FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. Pt 2.
10. GOTTLIEB, O. BORIN, M. R. de M. B. Natural products research in Brazil. *Ciência e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 49, n. 5/6, p. 315-320, 1997.
11. GRUENWALD, J. The market situation and marketing of herbal medicinal products (HPM) in Europe. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND

- AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997. *Abstracts*. Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPA, 1997b. p. L-33.
12. ISRAELSEN, L. D. United States regulatory status of botanical preparations. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997. *Abstracts*. Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPA, 1997b. p. L-44.
  13. LIBERALLI, C. H. Atitudes e rumos da indústria farmacêutica. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 25, n. 3, p. 122-133, 1944.
  14. MARQUES, L.C. Problemas na identificação de espécies vegetais usadas como matéria-prima na indústria de fitoterápicos no Paraná. In: XII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Curitiba — PR, p. 273, 1992.
  15. MARQUES, L.C.; BÓRIO, E, B.L. Produção e comercialização de Fitoterápicos no Paraná: uma abordagem de vigilância sanitária. In: XII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Curitiba — PR, p. 274, 1992.
  16. MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. *Caderno de Farmácia*, v. 5, n.1/2, p. 93-119, 1989.
  17. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.
  18. OLIVEIRA, F. & AKISUE, G. O problema da adulteração de drogas. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 54, n. 2, p. 71-83, 1973.
  19. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Pautas para la evaluación de medicamentos herbáricos*. Ginebra, 1991.
  20. RATES, S. M. K.; VON POSER, G. L.; GOSMAN, G.; APEL, M.; ROSA, A. M.; ANDRADE, L. *Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre — RS*. In: CONGRESSO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS DEL CONO SUR, 2, 1993. Montevideu, 1993.
  21. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; FARIAS, M. R.; SANTOS, R. I.; VIANNA, R. M. J.; SIMÕES, C. M. O. O controle de qualidade de insumos vegetais e fitoterápicos na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Caderno de Farmácia*, v. 2, n. 2, p. 139-151, 1986.
  22. SINDICATO DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO. *Contribuição do subgrupo de fitoterápicos do SINDUSFARM-SP à estruturação da fitoterapia no Brasil*. São Paulo, 1995, p.1-8.
  23. SOLDATI, F. The registration of medicinal plant products, what quality of documentation should be required ? The industrial point of view. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997. *Abstracts*. Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPA, 1997b. p. L-48.
  24. STAHL, E. *Analyse chromatographique et microscopique des drogues*. Paris: Moderne, 1975.
  25. VULTO, A. G. e SMET, P. A. G. M. Drugs used in non-orthodox medicine. In: DUKES, M. M. G. (Ed.) *Meyler's side effects of drugs*. 11 ed. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 999 — 1005.
  26. WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer, 1984.
  27. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneva, 1992.

Recebido para publicação em 14/05/1998

INCORPORAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Vibrio cholerae* O1 NÃO TOXIGÊNICO EM  
OSTRAS (*Crassostrea brasiliana*), VIVAS<sup>1</sup>

Dilma Scala GELLI<sup>2</sup>  
Miyoko JAKABI<sup>2</sup>  
Ivany Rodrigues de MORAES<sup>3</sup>  
Nélida del MASTRO<sup>4</sup>

RIALA 06/862

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; de MORAES, I. R. & MASTRO, N. del - INCORPORAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Vibrio cholerae* O1 NÃO TOXIGÊNICO EM OSTRAS (*Crassostrea brasiliana*), VIVAS. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 33-37, 1999.

RESUMO: As ostras são moluscos bivalves que, com frequência, são consumidas cruas. Podem ser objeto de processos de depuração (descontaminações físicas e químicas), pois este hábito de consumo está associado a eventos de doenças transmitidas por alimentos em vários países. No presente trabalho, foram realizados testes para verificar a possibilidade de contaminação de ostras em laboratório, com o objetivo de estabelecer modelo para avaliações de processos de depuração. As ostras foram mantidas vivas em água do mar previamente ozonizada. Foi procedida a contaminação da água com *Vibrio cholerae* El Tor O1 não toxigênico. Foram realizadas determinações analíticas da água e das ostras imediatamente após e depois de 2, 4, 12, 18 e 24 horas da contaminação. Após 2 horas, as ostras apresentaram positividade para o *V. cholerae* usado no experimento, em até a diluição  $10^7$ , igual ao número inicial de células viáveis imediatamente após a contaminação. Os níveis de presença da cepa testada manteve-se elevada, tanto na água como nas ostras, durante todo o período de observação (até a diluição  $10^9$  na água e  $10^8$  nas ostras). Os resultados obtidos indicam que este método é útil, pois permite a manutenção da viabilidade das ostras. A avaliação da eficácia e eficiência de processos tecnológicos de depuração (descontaminação), como o uso de ozônio e de radiação ionizante, pode ser conduzida, mantendo os parâmetros reais, inclusive com a presença da microbiota autóctone destes moluscos. A comparação das diluições positivas no decorrer do experimento, demonstram que a cepa adaptou-se às condições do experimento, apresentando inclusive multiplicação. Foram realizados três testes independentes (triplí-cata), para observar possíveis variações na incorporação da cepa.

DESCRITORES: Ostras, contaminação laboratorial. Incorporação de *V. cholerae* em ostras.

1. Trabalho realizado na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, projeto no. 8029/RB, IAEA (International Atomic Energy Agency). Parte da Dissertação de Mestrado de Moraes, I.R. "Estudo da Sensibilidade do *Vibrio cholerae* O1 à Radiação Gama de  $^{60}\text{Co}$  in vitro e in vivo em ostras (*Crassostrea brasiliana*) artificialmente contaminadas". São Paulo, 1996. Tese (Mestrado) — IPEN-USP.

2. Da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz

3. Pós graduanda do IPEN/CNEN — SP

4. Pesquisadora Titular do IPEN/CNEN — SP

## INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves<sup>1</sup> são organismos marinhos que, na fase adulta, tem hábitos e características particulares: são encontrados em áreas da costa marítima, fixos sobre e/ou ao redor de rochas ou de outras superfícies sólidas; apresentam duas valvas (conchas) que podem ser movimentadas por um músculo adutor e possuem uma estrutura biológica, na superfície da sua estrutura interna, denominada de manto. O manto é a estrutura que promove a captação de alimento: a água é dirigida, através do movimento de cílios laterais, para a parte inalante da cavidade do manto que, ao filtrá-la, retém as partículas em suspensão na água circundante. As partículas retidas pelo manto são dirigidas para o sistema digestivo. As partículas maiores são eliminadas através de contrações musculares. Os moluscos bivalves se alimentam do plancton (zôo e fitoplâncton) presentes na água do mar da área onde está fixado. Quando em atividade alimentar, as ostras podem filtrar até 6L de água por hora<sup>13</sup>. São considerados “animais sentinelas” da possível presença de microrganismos patogênicos no ambiente em que vivem, em função do seu processo de captura de alimentos que permite que microrganismos e substâncias químicas em suspensão na água do mar sejam concentrados em seus corpos<sup>2</sup>. Toxinas elaboradas por algas do ambiente marinho são veiculadas ao homem pelo consumo de moluscos bivalves, notadamente ostras. Estas toxinas são denominadas genericamente de toxinas marinhas<sup>11</sup>. No que se refere aos microrganismos, os moluscos bivalves podem ser veículos de bactérias, vírus e parasitos patogênicos ao homem<sup>1,5,7,11,12</sup>.

Por serem usados como alimentos, os moluscos bivalves são uma preocupação constante em termos de saúde pública. Levantamentos epidemiológicos identificam este organismo como veiculador de Enfermidades Transmitidas por Alimentos, seja de origem biológica (toxinas marinhas como a Toxina Paralisante dos Moluscos (TPM/PSP -Paralytic Shellfish Poison), a Toxina Diarréica dos Moluscos (TDM/DSP — Diarrhetic Shellfish Poison), as bactérias patogênicas (*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*), determinados vírus (como da hepatite infecciosa), determinados parasitos, contaminantes químicos (contaminantes inorgânicos), e outros<sup>1,5,7,11,12</sup>. Acrescente-se a isto o fato de que, dentre os moluscos bivalves, as ostras são consumidas também e principalmente sem cocção prévia<sup>5</sup>. Os apreciadores deste alimento o preferem ainda vivo, o que representa uma segurança de que o produto não está deteriorado e que seu valor nutritivo e sabor característicos estão preservados. Considerando a situação de risco que o consumo deste produto pode gerar, algumas medidas são indicadas para diminuir/controlar a carga de contaminação

que possam apresentar: autorização de extração dos moluscos bivalves somente de áreas marinhas controladas e aprovadas, depuração (pelo uso de água de qualidade controlada, tratada por luz ultra violeta e/ou adicionada ou não de cloro e/ou através de tratamento por ozônio) e radiação ionizante (1,5 a 3,0 kGy), entre outras<sup>4,6,8,9,10</sup>.

Os ensaios realizados em laboratório para verificar a eficácia dos tratamentos (processos de depuração) assinalados, para o controle de patógenos possivelmente presente nos moluscos bivalves são, no geral, realizados através da contaminação dos moluscos não mais vivos, seja por abertura forçada de suas conchas ou após esterilização por calor ou radiação ionizante. No que se refere às ostras existentes no Brasil, o processo de morte é iniciado com a abertura forçada das valvas do organismo para acesso às partes comestíveis, pois quando retirada da água a mesma mantém as valvas hermeticamente fechadas. Os dados bibliográficos disponíveis relatam avaliações laboratoriais da eficiência destes tratamentos, porém considerando a diminuição da carga bacteriana autóctone, ou então por contaminações *post mortem*, por processo esterilizante prévio.

O presente ensaio foi realizado para delinear experimentalmente a contaminação de ostras (*Crassostrea brasiliiana*) mantidas vivas, com *Vibrio cholerae*, tendo por base sua forma de captação natural de alimentos.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material:

Foram usadas 180 ostras (*Crassostrea brasiliiana*), procedentes de Cananéia, de planta de depuração de ostras por ozônio, em 3 lotes diferentes (60 por lote). As amostras de ostras foram transportadas sob refrigeração, acondicionadas em caixas de madeira, em camadas separadas por folhas de samambaia para manter a umidade necessária à sobrevivência das mesmas. As ostras foram recebidas pelo laboratório previamente limpas, por processo de remoção de cracas e organismos marinhos de hábitos fixos e de outras possíveis sujidades aderidas sobre a superfície externa de suas conchas e já tratadas pelo processo de ozonização (depuração em tanques, com borbulhamento de ozônio).

Foram usados 150L de água do mar da região de Cananéia, recebidas em 3 porções separadas, acondicionadas em galões de plástico atóxicos previamente higienizados e transportadas sob refrigeração.

Microrganismo empregado: *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa, não toxigênico, procedente da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Cultura para contaminação da água: em 20mL de Água Peptonada Alcalina (APA), foi semeado o microrganismo selecionado. Incubação a 35°C por 18-24h.

Aquário em vidro atóxico, capacidade para 60L de água.

**Método:**

Cerca de 40L de água foi vertida no aquário, no qual foram distribuídas 30-35 ostras. Foi procedido ao borbulhamento do ozônio por cerca de 30 minutos, usando aparelho tipo doméstico, com a finalidade de agitar e assim oxigenar a água, para estimular a abertura das valvas. Após esta agitação com conseqüente oxigenação, foi retirada uma amostra de água (aproximadamente 20mL) e 5 ostras para análise (controle inicial). Foi então adicionada à água 10mL da cultura do *V.cholerae* selecionado. Imediatamente após a contaminação e após períodos de 2, 4, 12, 18 e 24h, foram retiradas amostras de água e de ostras para fins de análise: 20mL de água, coletada após mistura da mesma e 5 unidades de ostras.

Análise das amostras de água: procedeu-se à diluição seriada da amostra, por transferência de 1mL da diluição precedente em 9 mL de APA estéril, até a diluição 10<sup>-10</sup>. Após incubação a 35°C/18-20h, o material de cada diluição foi semeado em superfície de agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose). Após incubação a 35°C por 18-24h, 3 a 5 colônias características e suspeitas de cada diluição positiva foram isoladas em meio IAL e em superfície de agar T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (meio sólido, com 1% de tripton, não adicionado e adicionado de 1% de cloreto de sódio, respectivamente). Após incubação, as colônias isoladas que apresentaram reações compatíveis com as de *V. cholerae*, foram testadas frente a oxidase e por sorologia polivalente. Foram caracterizadas como positivas as que apresentaram: colônias amarelas em TCBS; indol positivo; fermentação da glicose e da sacarose; oxidase e sorologia positivas; desenvolvi-

mento em meios com 0 e 1% de NaCl; L-triptofano desaminase, H<sub>2</sub>S, urease e produção de gás a partir da glicose, negativos<sup>1,3,4</sup>.

Análise das amostras de ostras: as mesmas foram abertas com assepsia, com auxílio de abridor de ostras em aço inox, previamente desinfetado. A parte comestível (toda a estrutura interna) foi retirada da concha e recolhida em copo de homogeneizador previamente esterilizado. A homogeneização foi realizada em aparelho tipo líquidificador. Do homogeneizado, foram retiradas 25g, diluídas e cuidadosamente misturadas em 225mL de APA (diluição 10<sup>-1</sup>). A partir desta, foram preparadas diluições seriadas como já descrito para as amostras de água. As demais etapas analíticas foram realizadas conforme descrito para a água.

Cada etapa analítica acima descrita foi realizada com controle de meios de cultura semeados com a cepa teste (controle positivo) e não semeados (controle de esterilidade).

**RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

Os resultados da relação do número de *V. cholerae* O1 em água e em ostras, estão expressos na Tabela abaixo.

A análise da água e das ostras, antes da contaminação com a cepa selecionada, revelaram ausência de *V. cholerae*. As diluições maiores do que as constantes na Tabela, foram negativas.

Os resultados expressos na Tabela são indicativos de que o ensaio proposto permite a contaminação de ostras vivas em nível laboratorial, permitindo avaliações de eficiência e eficácia de processos de depuração (descontaminação) destes moluscos, em condições mais próximas das reais.

O número de cinco unidades de ostras, é satisfatório e contribuiu para a representatividade das mesmas, pois tanto a abertura das valvas como o processo de filtração da

Tabela. Maiores diluições positivas de *Vibrio cholerae* O1 não toxigênico, em log de base 10 (log<sub>10</sub>) nos experimentos de contaminação de água e incorporação de *V.cholerae* O1 El Tor Ogawa não toxigênico em ostras *Crassostrea brasiliiana*, por períodos de exposição (imediatamente após a contaminação da água e de 2, 4, 12, 18 e 24 horas)

Tempo/substrato	0h		2h		4h		12h		18h		24h	
	A	Os	A	Os	A	Os	A	Os	A	Os	A	Os
Experimento 1	-7	Aus	-7	-7	-6	-7	-7	-7	-6	-7	-7	-7
Experimento 2	-7	Aus	-5	-6	-8	-8	-7	-8	-7	-8	-7	-7
Experimento 3	-7	Aus	-7	-7	-7	-7	-9	-7	-7	-7	-6	-7

h= horas A=Água Os=Ostra aus=ausência em 25g

água pode ser heterogênea entre as unidades vivas. Após contato de 2 horas em água artificialmente contaminada, a análise das 5 unidades de ostras apresentaram níveis de *V.cholerae* de mesma grandeza do que na água imediatamente após sua contaminação; nos períodos posteriores de observação, as diluições positivas de células viáveis presentes na água e nas ostras, mantiveram-se correspondentes. A positividade das diluições, nas amostras de água, foi maior após 12h do que a inicial (respectivamente em até  $10^{-7}$  no tempo 0 e em até  $10^{-9}$  após 12h), o que indica que ocorreu a multiplicação da cepa usada no experimento.

Os resultados obtidos em períodos superiores a 2 horas também permitem concluir que a cepa se adaptou

adequadamente no sistema e nas condições do experimento: manutenção, por até 24 horas, de números equivalentes de células viáveis tanto na água como nas ostras, com variações possíveis de ocorrerem em amostras de um mesmo lote de produto e por observações dos resultados das diluições. Observação anterior indica a possibilidade de multiplicação de Vibrionaceae em ostras após a sua captura<sup>2</sup>.

Conclui-se que o processo de captura de alimentos das ostras permite a sua contaminação em nível de laboratório, sem a necessidade de danificar sua estrutura biológica ou inativar sua microbiota natural.

RIALA 06/862

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; de MORAES, I. R. & MASTRO, N. del - EXPERIMENTAL INCORPORATION OF *Vibrio cholerae* O1 NON TOXIGENIC IN LIVE OYSTERS (*Crassostrea brasiliana*)1. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 58(2): 1999

ABSTRACTS: Oyster are frequently eaten raw and alive. Because of this, are often object of depuration process (physical and chemical decontamination), since its consumption habit has important epidemiological implications. It was performed essays to verify the possibility of live oyster contamination at laboratorial level: oysters was maintained alive in sea water previously ozonized and then contaminated with *Vibrio cholerae* El Tor, O1, Ogawa, non toxigenic. Quantitative analytical determination was realized in sea water and oysters, immediately and 2,4,12,18 and 24h after the contamination. After 2h, oysters presented high numbers of *V. cholerae*, namely positivity in  $10^{-7}$  dilution, compatible with the initial sea water contamination. The levels of the strain used in this experiment was constantly high during the period of observation (positivity till  $10^{-9}$  dilution in water and  $10^{-8}$  in oysters). The results obtained indicate that this contamination may be useful for laboratorial observation of efficacy and efficiency of technological depuration (decontamination) process of oysters, since allow measurements at real conditions. Number of viable cells obtained at different periods of time shows that the strain was capable of adaptation, including multiplication, in this experiment. It was realized three independent experiments.

KEY WORDS — Oysters, laboratorial contamination. *V. cholerae* incorporation in oysters.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA — American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3th. ed. Carl Vanderzant & Don F. Splittstoesser, editores. p. 791.1992.
2. COOK, D.W. and RUPLE, A.D. Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in postharvest shellstock oysters. *J. Food Protect.* 52:343-349. 1986.
3. ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and others *Vibrio spp.* In *Bacteriological Analytical Manual*, F.D.A. 7th.Ed. 1992. Publicado e distribuído por AOAC International, Arlington, V.A.
4. ICMSF — International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbial Ecology of Foods, vol. 1. *Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. Academic Press. London and N.York. 1980.
5. INSTITUTE OF MEDICINE. Committee on Evaluation of the Safety of Fishery Products. Sea Food Safety. Farid E. Ahmed, editor. National Academic Press. Washington, D.C. Cap. 2,3,4 e 6. 1991.

6. JAY, J.M. Modern Food Microbiology. 4th. Ed. Chapman & Hall. N.York and London. p.297-300 e 342. 1992.
7. KLONTZ, K.C.; TAUXE, R.V.; COOK, W.L.; RILLEY, W.H.; WACHMUTH, K. Cholera after the consumption of raw oysters. *Annals of International Medicine*, v.107, p. 846, 1987.
8. OPS-OMS/IAEA-FAO-ONU. Informe final. Consulta técnica conjunta FAO/IAEA/OPS-OMS sobre el uso de irradiacion como medida de intervencion de salud publica para el control de enfermedades transmitidas por alimentos en Latino America y El Caribe. HPV/FOS/126/92. 1992.
9. RICHARDS, G.P. Microbial purification of shellfish: A review of depuration and relaying. *J. Food Protect.* 51:218-251. 1988.
10. RUBIO, T.C. Uso de la irradiacion como medida de intervencion para controlar enfermedades transmitidas por alimentos en Latino America y El Caribe. 2o. Informe del Contrato de Investigacion 7781/RB, IAEA (International Atomic Energy Agency)/Chile. Abril, 1997.
11. UNIVERSITY OF ADELAIDE, Australia. Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Ian R. Falconer, editor. Academic Press. 1993.
12. VARNAM, A.H. & EVANS, M.G. Foodborne Pathogens — an Illustrated Text. Wolfe Publishing. p.176-177. 1991.
13. WOOD, P.C. The principles and methods employed for the sanitary control of molluscan shellfish. Technical Conference on Marine Pollution and its Effect on Living Resources and Fishing. MP/70/R-12. WHO/FAO. 1970.

Recebido para publicação em 25/06/1998

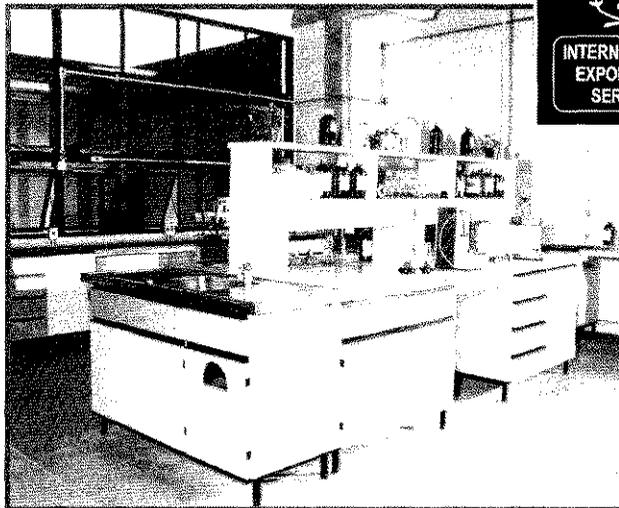
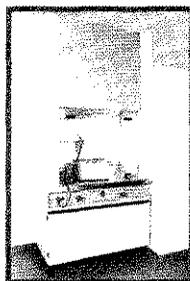
# IBRAM. A MELHOR SOLUÇÃO EM MÓVEIS PARA LABORATÓRIOS.

## Projetos e Execuções

Arquitetura  
Elétrica  
Hidráulica  
Gases em Geral  
Ar-condicionado e Exaustão  
Civil

## Mobiliário

Bancadas Laterais e Centrais  
Cabines Sensoriais  
Mesas Anti-vibratórias / Microscópio  
Capelas / Coifas  
Válvulas e Tomadas  
Armários para reagentes e superiores  
Chuveiro e Lava-olhos



GRUPO  
**IBRAM**  
DO PROJETO À INSTALAÇÃO  
SOLUÇÃO EM LABORATÓRIOS

Rua Vergueiro, 8.250 - São Paulo - SP - Cep 04272-300  
Fones: (011) 274-0166 - Fax: (011) 272-7468  
<http://www.ibram.com.br> (home page)  
[ibram@ibram.com.br](mailto:ibram@ibram.com.br) (e-mail)

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE TECNOLÓGICA DE MASSA ALIMENTÍCIA SECA À BASE DE PLASMA BOVINO\*

Alessandra E. V. G. da SILVEIRA\*\*  
Leonor Almeida de SOUZA-SOARES\*\*\*  
Eliana BADIALE-FURLONG\*\*\*\*

RIALA 06/863

SILVEIRA, A. E. V. G. da; SOUZA-SOARES, L. A. & BADIALE-FURLONG, E. — Avaliação da qualidade tecnológica de massa alimentícia seca à base de plasma bovino. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 39-44, 1999

**RESUMO:** foi proposto o desenvolvimento de uma formulação alternativa de massas alimentícias substituindo-se os ovos por plasma bovino. O produto foi avaliado quanto à sua qualidade tecnológica, frente a uma massa à base de ovos, tradicionalmente disponível no comércio, através da determinação do seu tempo de cocção, capacidade de absorção e retenção de água, perda de sólidos e proteínas e pelo deslocamento de volume. Os resultados obtidos demonstraram que a massa à base de plasma atingiu o ponto *al dente* em 3/4 do produto padrão, possuiu maior capacidade de absorção de água (61,8%), menor perda de sólidos (0,8%) e de proteínas (0,7%). O comportamento tecnológico diferenciado dos produtos foi evidenciado por análise de componentes principais.

**DESCRITORES:** massa alimentícia, plasma bovino, qualidade tecnológica

### INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, particularmente nos países em desenvolvimento, torna-se importante a busca de meios de aproveitar os recursos agropecuários incluindo os subprodutos e resíduos do seu processamento. O Rio Grande do Sul é um estado com grande atividade pecuária, onde a maioria dos subprodutos resultantes não é utilizada para fins de alimentação humana e tem pouco valor comercial.

Nos matadouros industriais, o sangue bovino é um dos subprodutos com maior poder contaminante que se produz, sendo sua eliminação essencial para reduzir a carga orgânica em seus efluentes.<sup>22</sup> Além disso, para as

indústrias cárnicas se tornarem economicamente competitivas é essencial utilizarem melhor seus subprodutos empregando-os, por exemplo, como fonte protéica.<sup>12, 22</sup> No Brasil estima-se que em 1997 foram abatidas aproximadamente 29,5 milhões de cabeças de gado resultando em cerca de 312 milhões de litros de sangue, que em termos de proteína, correspondem a aproximadamente 54000 toneladas desperdiçadas.<sup>15, 16</sup>

O sangue bovino, muito rico em proteínas, tem sido estudado no sentido de caracterizá-lo e de sugerir seu uso em outras formulações de alimentos, além da convencional (embutidos), porém permanece ainda desprezado. O plasma bovino pode ser separado das hemácias por um processo bastante simples. Considerando-se que

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

\*\* Mestre em Engenharia de Alimentos

\*\*\* Dr<sup>a</sup> em Ciência de Alimentos

\*\*\*\* Dr<sup>a</sup> em Ciência de Alimentos

o mesmo também é rico em proteínas, possui melhores características sensoriais que o sangue inteiro e excelentes propriedades funcionais, estudos a seu respeito visando sua utilização no preparo de alimentos convencionais como formulações alternativas, são necessários.<sup>7, 11, 13, 17, 19</sup>

Uma forma de utilizar esse plasma é enriquecendo os produtos à base de cereais, visto que estes estão presentes, rotineiramente, na dieta da maioria dos povos e no entanto, têm valor protéico discutível. Destacam-se, dentre estes, as massas alimentícias à base de ovos que, além de maior valor nutricional em relação às massas comuns (à base de farinha e água), trazem um maior valor comercial, o que pode ser proibitivo para algumas pessoas.<sup>19</sup>

As massas alimentícias são ideais para veicular nutrientes pela facilidade de obtenção de sua matéria-prima, pela simplicidade do processo de fabricação, pelo seu baixo custo e finalmente por seu valor nutritivo.<sup>4, 10, 14</sup>

A praticidade de sua utilização, a facilidade de manuseio e a boa estabilidade durante o armazenamento fazem com que as massas alimentícias sejam consumidas nas mais diversas regiões do país e por todas as classes sociais.<sup>2, 3, 5, 6, 14</sup> É importante lembrar que a proteína da farinha de trigo, matéria-prima das massas alimentícias, é deficiente em lisina e treonina. A intenção de substituir os ovos por plasma bovino (rico em lisina e treonina), possibilita a obtenção de um alimento de bom valor protéico e baixo custo, criando uma alternativa para diminuir os problemas nutricionais da população.<sup>9, 20</sup>

O desenvolvimento deste alimento alternativo, requer um estudo mais detalhado para se verificar a possibilidade de obtenção de uma massa alimentícia com qualidade tecnológica comparável a do produto tradicionalmente disponível no comércio.

No Brasil, a qualidade das massas tem sido estimada através de seu desempenho durante o cozimento. Além do teste de cozimento, a cor e textura do produto final também devem ser consideradas.<sup>3, 8</sup> Entretanto, este tipo de avaliação é quase inexistente nas indústrias do país e são poucos os pesquisadores que trabalham com este setor de produtos alimentícios, de modo que existem muitas carências nesta área, tais como a falta de um perfil do padrão de qualidade destes produtos. A Itália, pelo elevado consumo destes produtos, é o país que apresenta maior desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade de massas.

Os testes de cozimento dão informação de como o produto se comporta durante a cocção, em particular, da quantidade de água absorvida e de substância lixiviada, durante o processo, bem como do aumento do volume e da textura.<sup>18</sup>

A determinação dos parâmetros relacionados com a qualidade de cozimento pode ser efetuada sem auxílio de

equipamentos sofisticados porém, ao analisar a qualidade do cozimento do produto deve-se levar em consideração principalmente o tamanho, forma e espessura. Assim, só se pode comparar a qualidade de cozimento quando se trata de massa do mesmo tipo.<sup>3, 8</sup>

A textura de massas alimentícias de boa qualidade deve ter as características *al dente*, como dizem os italianos.<sup>3, 8</sup> Por outro lado, os consumidores brasileiros nem sempre aceitam essa característica, preferindo muitas vezes uma textura menos firme.

A partir destas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade tecnológica de uma massa alimentícia seca do tipo curta, produzida em escala laboratorial, empregando o plasma bovino como substituto dos ovos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o preparo da massa alimentícia, os ingredientes foram misturados observando-se as quantidades conforme uma formulação base desenvolvida previamente: para cada 1000 g de farinha de trigo foram adicionadas 450 g de plasma bovino e 0,25 g de  $\beta$  caroteno (160.000 UI/g).<sup>19</sup> Após a homogeneização, a massa foi extrusada com uso de trefila, cortada no tamanho desejado e submetida à secagem.

A secagem da massa à base de plasma foi realizada em estufa com circulação de ar a 50°C por 30 minutos (pré-secagem), seguido de um período de repouso onde a fonte de calor foi desligada por 30 minutos. A fonte de calor foi então novamente ligada em temperatura mais elevada (80°C) por 1 hora. O teor de umidade da massa (determinado segundo a AOAC<sup>1</sup>) foi reduzido de aproximadamente 30% para 12%. Posteriormente, o produto obtido foi embalado e armazenado.

A qualidade tecnológica da massa formulada foi determinada pelos seguintes parâmetros:

a) Tempo de Cocção: tempo de cozimento necessário para que 20 g de massa com 2 g de sal, em 200 ml de água, atingisse o ponto *al dente*, de acordo com Leitão *et al.* (1990).<sup>8</sup>

b) Absorção de Água: foi determinada pelo aumento de peso de amostras de 20 g de massa crua, após o processo de cocção. O valor foi obtido pela seguinte relação:<sup>8</sup>

$$(P_{\text{ESO FINAL}} - P_{\text{ESO INICIAL}}) \times 100 / P_{\text{ESO FINAL}}$$

c) Deslocamento de Volume: foi determinado pelo deslocamento de volume de amostras de 20 g de massa crua, após o processo de cocção, em uma proveta com 200 ml de água. O valor foi obtido pela relação<sup>8</sup> ( $V_{\text{OL. FINAL}} - V_{\text{OL. INICIAL}}$ )  $\times 100 / V_{\text{OL. INICIAL}}$

d) Perda de Sólidos: foi determinada pelo método de secagem a 105°C, onde a amostra utilizada foi a água obtida após a cocção de 20 g de massa.<sup>8</sup>

e) Perda de Proteínas: foi determinada nos sólidos resultantes da determinação de sólidos, pelo método de Kjeldahl<sup>1</sup> com o fator de conversão 5,7.

f) Capacidade de Retenção de Água: foi determinada de acordo com WANG & KINSELLA (1976)<sup>23</sup> adaptado por TEIXEIRA, FURLONG & MELLADO (1996)<sup>21</sup>, brevemente descrito. Amostras de 1,0 g foram homogeneizadas em 10 ml de água e submetidas a um aquecimento em banho-maria a 80°C por 45 minutos, centrifugadas a 2000 rpm por 20 min. O aumento de peso das amostras foi determinado após a absorção. A porcentagem de água retida foi calculada, pela seguinte fórmula:

$$\left( \frac{P_{\text{ESO FINAL AMOSTRA}} - P_{\text{ESO INICIAL AMOSTRA}}}{P_{\text{ESO FINAL}}} \right) \times 100$$

As análises foram realizadas em amostras da massa alimentícia desenvolvidas à base de plasma e em amostras de massa à base de ovos, tradicionalmente encontrada no comércio, de mesmo formato do produto proposto.

Para avaliação dos resultados obtidos através dos métodos descritos, foi utilizado um tratamento estatístico dos dados, com o auxílio do *software* "Statistic for Windows" (versão 4.3), nos módulos de estatística básica (média) e de análise fatorial. Para atender os requisitos de aplicação desses tratamentos, os experimentos foram realizados em triplicata na determinação do tempo de cocção e para os demais parâmetros de qualidade, foram realizadas 25 repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro parâmetro estudado para determinar a qualidade tecnológica das massas alimentícias foi o tempo de cocção. Os resultados, da média de três repetições, foram de 12 minutos para massas à base de ovos (padrão) e 9 minutos para a massa à base de plasma.

Com base nestes resultados, pode-se dizer que a massa à base de plasma de acordo com a formulação desenvolvida atinge o ponto *al dente* em 3/4 do tempo do produto padrão. Este fato geralmente é levado em consideração pelos consumidores, pois eles exigem cada vez mais que os produtos sejam de rápido preparo.

Os parâmetros deslocamento de volume, absorção de água, capacidade de retenção de água, perda de sólidos e proteínas foram primeiramente submetidos a uma análise descritiva, cujos resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Qualidade tecnológica das massas alimentícias

Parâmetro	Massa à Base de Plasma Bovino Média*(%)	Massa à Base de Ovos (Padrão) Média *(%)
Deslocamento Volume	145,6	147,3
Absorção de Água	61,8	55,4
Capacidade de Retenção de Água	68,6	75,9
Perda de Sólidos	0,8	2,3
Perda de Proteínas	0,7	2,4

\* 25 repetições

Esses resultados mostraram que a massa à base de plasma apresentou maior capacidade de absorção de água, o que conseqüentemente gera um maior rendimento do produto. Além disso, a formulação desenvolvida perdeu menos sólido e menos proteína, o que só vem a contribuir para sua qualidade, pois os consumidores preferem aqueles produtos que, após a cocção, não perdem muitos sedimentos para água, pois geralmente essas massas ao resfriarem tornam-se pegajosas.

A pequena perda de proteínas contribuiu favoravelmente para a qualidade da massa desenvolvida, não apenas tecnológica mas também nutricional, enriquecendo em termos protéicos este produto.

Com relação ao deslocamento de volume, pode-se dizer que a diferença foi relativamente pequena, não diminuindo a qualidade de um produto em relação ao outro.

No caso da capacidade de retenção de água, a diferença demonstrou que a massa padrão foi superior em relação a massa à base de plasma. Este fato provavelmente se evidenciaria se as duas massas fossem cozidas e resfriadas lentamente. Após algum tempo, provavelmente a massa à base de plasma começaria a perder água em maior quantidade do que a massa padrão, resultando em um aspecto menos atrativo. Esse aspecto torna-se mais relevante quando a massa alimentícia é utilizada na elaboração de pratos frios como saladas.

Como discutido, as massas apresentaram comportamento tecnológico diferenciado, aplicou-se então, uma análise estatística fatorial de componentes principais (Tabela 2), para verificar a contribuição de cada parâmetro.

Tabela 2. Análise fatorial das massas alimentícias

Parâmetro	Massa à Base de Ovos		Massa à Base Plasma Bovino	
	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2
Capacidade de Absorção de Água	0,06	0,85*	- 0,30	- 0,68
Capacidade de Retenção de Água - 0,86*		0,16	0,91*	- 1,63
Deslocamento de Volume	- 0,26	0,68	- 0,19	0,53
Perda de Sólidos	0,91*	0,21	- 0,83*	- 0,30
Perda de Proteínas	0,40	0,69	0,11	0,80*

\*Componentes principais dos fatores

Obtiveram-se dois fatores para cada massa e verificou-se que o fator principal foi semelhante para ambas as massas, sendo formado pela capacidade de retenção de água e pela perda de sólidos, porém, em ordem de importância invertida. O fator mostrou que quando ocorreu um aumento da perda de sólidos, ocorreu a diminuição da capacidade de retenção de água.

A capacidade de retenção de água foi mais importante para a massa à base de plasma, enquanto que a perda de sólidos tornou-se mais importante para a massa à base de ovos.

O fator 1 explicou 39,7% da variância para a massa de ovos e 37,8% para a de plasma bovino.

No segundo fator os produtos começaram a diferir mais, demonstrando o comportamento peculiar de cada um. A capacidade de absorção de água tornou-se a variável mais importante para a massa com ovos e a perda de proteínas para a massa com plasma (explicação da variância de 30,9% e 25,7%, totalizando 70,6% e 63,5% de explicação da variância respectivamente). Porém para massa à base de ovos a perda de proteínas e o deslocamento de volume também apareceram desempenhando um forte papel, e, no caso da massa à base de plasma, o outro componente de destaque foi a capacidade de absorção de água.

Esta análise demonstrou, então, que todas as variáveis foram importantes na determinação da qualidade tecnológica, porém a diferenciação dos produtos pode ser melhor observada pela capacidade de retenção de água, perda de proteínas e de sólidos. Isto sugere que se dê preferência a estas análises quando a intenção for identificar se o produto é à base de plasma ou ovos, não esquecendo, porém, de que se trata de uma observação restrita à formulação desenvolvida neste trabalho, devendo-se considerar o teor de plasma e o tamanho e tipo de massa em futuras comparações. O parâmetro deslocamento de volume foi o de menor influência na caracterização dos produtos, não devendo, porém, ser descartado.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, nas condições experimentais utilizadas no desenvolvimento e avaliação da formulação alternativa de uma massa alimentícia seca à base de plasma bovino, em laboratório, pode-se dizer que:

A massa à base de plasma atingiu o ponto *al dente* em 3/4 do tempo do produto padrão, possuiu maior capacidade de absorção de água (61,8%), menor perda de sólidos (0,8%) e de proteínas (0,7%) enquanto que a capacidade de retenção de água foi superior na massa à base de ovos;

O comportamento tecnológico diferenciado foi evidenciado pela análise de componentes principais, onde o primeiro fator para ambas as massas foi formado pela capacidade de retenção de água e pela perda de sólidos, porém em ordem de importância invertida. O fator mostrou que quando ocorreu um aumento da perda de sólidos, ocorreu diminuição da capacidade de retenção de água. O segundo fator demonstrou o comportamento peculiar de cada produto, porém verificou-se que todas as variáveis foram de importância na determinação da qualidade tecnológica, sendo que a diferenciação dos produtos pode ser melhor observada pela capacidade de retenção de água, perda de proteínas e de sólidos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. MSc. Tabajara Lucas de Almeida, do Departamento de Matemática da Fundação Universidade do Rio Grande pelo auxílio no tratamento estatístico dos resultados.

Silveira, A. E. V. G. da; SOUZA-SOARES, L. A. & BADIALE-FURLONG, E. Technological quality evaluation of dried plasma pasta.

**ABSTRACT:** The development of an alternative formulation of pasta was considered by replacing eggs for bovine plasma. The product was evaluated for its technological quality in contrast to a traditionally egg pasta available on the market place, through determination of its cooking time, water absorption and retention capacity, loss of solids and proteins in the cooking water and for volume displacement. The results obtained demonstrated that the bovine plasma pasta reaches the *al dente* point in 3/4 of the time of the standard product, it posses greater capacity of water absorption (61.8%) and decreased loss of solids (0.8%) and proteins (0.7%). The differentiated technological behavior of the products was indicated by main components analysis.

**KEY WORDS:** pasta, bovine plasma, technological quality

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC — ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 16 ed., Arlington, USA, 1995.
2. BAHNASSEY, Y. & KHAN, K. Fortification of spaghetti with edible legumes. II. Rheological, processing, and quality evaluation studies. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 63, n. 3, p. 216 — 219, 1986.
3. CIACCO, C. F. & CHANG, Y. K. *Tecnologia de massas alimentícias*. São Paulo: Ícone, 1986, 127 p.
4. DE STEFANIS, E. & SGRULLETTA, D. Valore nutrizionale e culinario delle paste di produzione nazionale: parte II. *Tecnica Molitoria*, Pinerolo, v. 48, n.5, p. 529 — 535, 1997.
5. DICK, J. W. & MATSUO, R. R. Durum wheat em pasta products. In: POMERANZ, Y. *Wheat: chemistry and technology*. 3 ed. Minnesota, USA: AACC, 1988. v.2, p. 507 — 547.
6. FEILLET, P.; ABECASSIS, J.; AUTRAN, J. C. & LAIGNELET, T. Past and future trends of academic research on pasta and durum wheat. *Cereal Foods Worlds*, Saint Paul, v. 41, n. 2, p. 205 — 212, 1996.
7. LANGHOFF, L. Prelievo, raccolta, essiccazione del sangue di macellazione per consumo umano. *Industrie Alimentari*, Pinerolo, v.19, n. 12, 1980.
8. LEITÃO, R. F. F.; GONÇALVES, J. R.; EIROA, M. N. U. & GARCIA, E. E. C *Tecnologia de macarrão*. Campinas: Manual Técnico — ITAL, 1990, n. 5, 71p.
9. LEÓN, J. M.; GODINEZ, M. P. M. & SALOMÓN, P. C. Desarrollo de una pasta para sopa diseñada de acuerdo a los gustos y recomendaciones nutricias para los ancianos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Caracas, v. 47, n. 2, p. 152 — 156, 1997.
10. LYRA, M. S. *Como iniciar uma indústria de macarrão e massas para sopa*. Rio de Janeiro. 3 ed. Rio de Janeiro: Departamento de Assistência à Média e Pequena Indústria, 1982, 55 p.
11. OCKERMAN, H. W. & HANSEN, C. L. *Industrialización de subproductos de origen animal*. Espanha: Acribia, 1994, p. 387.
12. OSHODI, A. A. & OJOKAN E. O. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry*, v. 59, n. 3, p. 333 — 338, 1997.
13. PISKE, D. Aproveitamento de sangue de abate para a alimentação humana. I. Uma revisão. *Bol. ITAL*, Campinas, v. 19, n. 3, p. 253 — 308, 1982.
14. QUAGLIA, G. B. Paste da cereali alternativí, paste aglutiniche ed aprotiche, paste arricchite. *Tecnica Molitoria*, Pinerolo, v. 48, n.6, p. 667 — 680, 1997.
15. REVISTA NACIONAL DA CARNE, São Paulo, Ano XX, no 241, p. 81, 1997a.
16. REVISTA NACIONAL DA CARNE, São Paulo, Ano XX, no 246, p. 97, 1997b.
17. SAITO, M.; ICHIKAWA, N. & TAIRA, H. Fractionation and emulsifying properties of plasma proteins. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 52, n.11, p. 2831 — 2836, 1988.
18. SANGRONIS, E. & CAFIERO, J. & MOSQUEDA, M. Calidad de cocción de pastas largas suplementadas con salvado de arroz. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Caracas, v. 47, n. 2, p. 146 — 151, 1997.
19. SILVEIRA, A. E. V. G. da & BADIALE-FURLONG, E. Formulação de uma massa Alimentícia alternativa: enriquecimento com plasma bovino. *Alimentos e Nutrição*, v. 9 (no prelo), 1998.
20. SILVEIRA, E. T. F.; TRAVAGLINI, D. A.; VITTI, P.; CAMPOS, S. D. S.; AGUIRRE, J. M.; FIGUEI-

- REDO, I. B. & SHIROSE, I. Farinha composta de resíduo do extrato de soja e de arroz em mistura com trigo para uso em panificação. *Bol. ITAL*, Campinas, v. 18, n. 4, p. 543 — 561, 1981.
21. 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.
22. TORRES, M. R.; RAMOS, A. J. & SORIANO, E. Aspectos funcionales y Nutricionales de las proteínas sanguíneas: empleo en la industria cárnica. *Alimentaria*, v. 282, p. 63 — 69, 1997.
23. WANG, J. C. & KINSELLA, J. E. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 41, p. 286 — 292, 1976.

Recebido para publicação em 30/06/1999

## VERIFICAÇÃO DO ESTADO DE CONSERVAÇÃO E DA UTILIZAÇÃO DE SAIS DE PROPIONATO EM PÃES DE FORMA\*

Gisélia CAMPOS\*\*  
Maria de Fátima GOMIDES\*\*  
Kleber Eduardo Silva BAPTISTA\*\*  
Heloiza Maria de Oliveira Horta FRANKLIN\*\*  
Rita Maria Lopes Portocarrero NAVEIRA\*\*  
David Lee NELSON\*\*\*  
Tânia Mara Amâncio Guerra PEIXOTO\*\*  
Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA\*\*  
Maria Berenice Cardoso Martins VIEIRA\*\*

RIALA 06/864

CAMPOS, G. *et al.* — Verificação do estado de conservação e utilização de sais de propionato em pães de forma. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 45-52, 1999.

**RESUMO:** o ácido propiônico é usado sob a forma de sais de cálcio e sódio como conservador de produtos como chocolate, picles, massas e produtos de confeitaria e panificação, devido à sua propriedade fungicida. Foi feita uma amostragem estatística a partir dos Supermercados e Padarias das 9 (nove) regionais de Belo Horizonte: Oeste, Norte, Nordeste, Leste, Venda Nova, Pampulha, Barreiro, Noroeste e Centro Sul. Foram analisadas 191 amostras de pão de forma coletadas pelo Serviço de fiscalização da Prefeitura Municipal, num total de 24 marcas diferentes. O teor médio encontrado de propionato, expresso em ácido propiônico, foi de 0,13% com um percentual de reprovação de 12,56%. O método de análise utilizado foi a extração do ácido propiônico com éter e a cromatografia gasosa para a quantificação. Quanto à contagem de bolores e leveduras 12,70% das 189 amostras analisadas apresentaram resultado acima do limite máximo permitido. A determinação de umidade foi feita em 56 amostras, sendo que 37 (66,07%) apresentaram teor acima do permitido pela legislação. As amostras foram analisadas dentro do prazo de validade e foi observada uma variação muito grande deste prazo, até mesmo para uma mesma marca.

**DESCRITORES:** conservadores, ácido propiônico, fungicida, pão de forma, bolores e leveduras

### INTRODUÇÃO

O conceito de deterioração fúngica dos alimentos, está normalmente associado à presença de crescimento visível de colônias na sua superfície.

No entanto, um produto pode mostrar-se alterado por bolores, independente da visualização das colônias, alteração esta devida principalmente, à atividade hidrolítica apresentada por muitas espécies. Isto, torna extremamente importante o adequado controle da proliferação de

\* Realizado no laboratório de Química Bromatológica da Fundação Ezequiel Dias com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais.

\*\*Da Fundação Ezequiel Dias

\*\*\*Da Faculdade de Farmácia da UFMG

bolores nos alimentos (ROITMAN, 1988). Os tipos de alteração microbiana mais abundantes no pão são o amolecimento e a viscosidade excessiva, chamados geralmente de pão florecido e pão filamentosos. Os fungos constituem a causa mais frequente e, portanto a mais importante alteração do pão e dos produtos de panificação (FRAZIER, 1972).

O ácido propiônico e seus sais são usados como inibidores de fungos e bactérias bacilares em pães. A maioria dos fungos é destruída quando o pão é assado, mas a recontaminação da superfície pode ocorrer sob a embalagem durante o armazenamento do pão. Este efeito antimicrobiano é limitado para a maioria das leveduras e bactérias. Propionatos podem ser adicionados à massa do pão sem interferir no processo de fermentação, uma vez que eles têm pouco ou nenhum efeito sobre as leveduras (DOORES, 1983). No Brasil, este aditivo é conhecido como "anti-mofo" pelos panificadores e é comercializado sem a descrição no rótulo do princípio ativo e sua concentração. Há apenas indicação da dose a ser adicionada por kg de farinha.

A toxicidade do ácido propiônico para fungos e bactérias está relacionada com a incapacidade desses microorganismos de metabolizá-lo (LINDSAY, 1976; BRASIL, 1988). Juntamente com seus sais, tende a ser altamente específico frente aos fungos, sendo sua ação inibitória mais fungostática que fungicida. Alguns ácidos graxos afetam a permeabilidade celular ao atacar a membrana celular dos microorganismos. Ainda não está claro até que ponto a atividade fungostática do ácido propiônico se deve a este fenômeno (JAY, 1973).

De acordo com o "Code of Federal Regulation" o ácido propiônico e seus sais de sódio e cálcio podem ser utilizados em farinhas e pães na proporção de até 0,32% (DOORES, 1983). A legislação brasileira estabelece para produtos de panificação um limite máximo de 0,200% (p/p) expresso em ácido propiônico e  $5,0 \times 10^3$  UFC/g de bolores e leveduras (BRASIL, 1988; BRASIL, 1997).

Como o pão de forma é um produto bastante consumido tanto na alimentação caseira como em lanchonetes, é importante um levantamento de dados à respeito da utilização do ácido propiônico, necessário para aumentar a vida de prateleira deste produto. O ácido propiônico é um aditivo considerado GRAS (generally recognized as safe) para uso em soluções antissépticas para superfícies que entram em contato com alimentos e como aditivo para grãos antes da silagem (FDA). Quando aplicado diretamente no alimento há os limites estabelecidos para o seu uso com segurança. Portanto deve ser feito um controle rigoroso das quantidades utilizadas de ácido propiônico, nos produtos consumidos pela população.

## MATERIAL E MÉTODOS

O tamanho da amostra foi definido estatisticamente a partir de listagens dos estabelecimentos comerciais classificados como trailers e padarias, enviadas pelo Serviço de Vigilância Sanitária das nove administrações regionais da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (Barreiro, Centro Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha e Venda Nova) e de supermercados enviada pela Associação Mineira de Supermercados.

A escolha dos estabelecimentos foi feita através de tabelas de números aleatórios (GOMES, 1987). De cada um deles foi coletada 1 amostra de cada tipo de produto e de cada marca comercial (total de 24 marcas denominadas de A a Z) e os que não existiam na ocasião da coleta foram substituídos por outros. O número total de amostras de pães de forma analisadas foi 191 (Tabela 1).

Tabela 1. Número de estabelecimentos e de amostras coletadas por Regional de Belo Horizonte.

REGIONAL	Nº ESTABELECIMENTOS	TOTAL DE AMOSTRAS COLETADAS
Barreiro	13	13
Centro-Sul	12	41
Leste	15	28
Nordeste	15	32
Noroeste	15	28
Norte	05	05
Oeste	09	12
Pampulha	07	08
Venda Nova	16	24
Total	107	191

1 — Determinação de ácido propiônico em pães de forma

Extração: Juntamente com 1g de pão de forma foi colocado em um tubo de vidro 4ml de solução de ácido fórmico 3% em éter e 1 ml de ácido butírico 1% em éter usado como padrão interno. A extração foi feita agitando esta mistura com um bastão de vidro por 5 minutos em banho de gelo.

Quantificação: após decantação, 1 microlitro do extrato foi injetado em cromatógrafo à gás CG Advanced 500 com detetor de ionização de chama, acoplado a integrador CG 300 sob as seguintes condições:

— coluna DEGS 10% + ácido ortofosfórico sobre Chromossorb W, aço inox, diâmetro 1,8" x 6 pés.

— programação de temperatura da coluna:  $T_i$ : 90 °C/3 min.

rampa: 1 °C/ min.

$T_f$ : 100 °C

— fluxo do gás de arraste ( $N_2$ ): 30 ml/min

— Temperatura do detector: 250 °C

— fluxo dos gases no detector = ar = 300 ml/min.

$H_2$  = 30 ml/min.

— Temperatura do vaporizador = 200 °C (Campos e col., 1997)

### 2 — Determinação de umidade

Foi feita à 105 °C até obtenção de peso constante (São Paulo, 1985).

### 3 — Contagem de bolores e leveduras

A contagem em placas de bolores foi realizada em duplicata utilizando-se o meio ágar batata-dextrose, acidificado com ácido tartárico a 10% e incubando-se a  $23 \pm 2$  °C, por 3-5 dias (APHA, 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas da solução padrão contendo ácido propiônico ( $Tr'$  2,465) e ácido butírico como padrão interno ( $Tr'$  3,775) e do extrato de uma amostra de pão de forma. A tabela 2 mostra os teores médios de propionato (em ácido propiônico) e da contagem de bolores e leveduras encontrados nas amostras nas diversas regionais de Belo Horizonte. O ácido propiônico variou de zero a 0,41% (tabela 4) e os bolores e leveduras de zero a incontáveis UFC/g (tabela 5). Os resultados mostram que de maneira geral os valores encontrados para propionato estão na mesma proporção em todas as regionais. Os teores mais altos de ácido propiônico foram encontrados na regional Oeste. A regional Nordeste apresentou maior variação nos resultados, ou seja, alguns estabelecimentos comercializam pão de forma com teor elevado de propionato (0,41%) e outros com teores menores ou até mesmo nenhum. O teor médio para propionato considerando as 191 amostras foi de  $0,13 \pm 0,07$ , havendo uma variação grande nos resultados das amostras agrupadas como sem marca (Z) e nas de uma mesma marca principalmente na designada de T. 12,56% das amostras apresentaram teor acima de 0,20% de propionato que é o máximo permitido pela legislação (BRASIL, 1988).

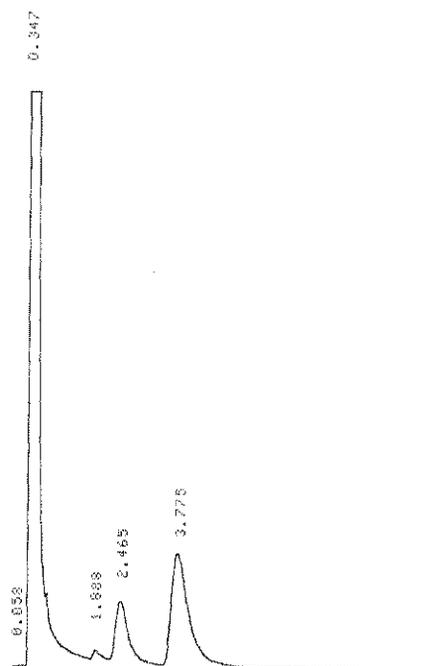


Figura 1 — Cromatograma da solução padrão de ácido propiônico ( $Tr'$  = 2,465) e ácido butírico ( $Tr'$  = 3,775), coluna DEGS.

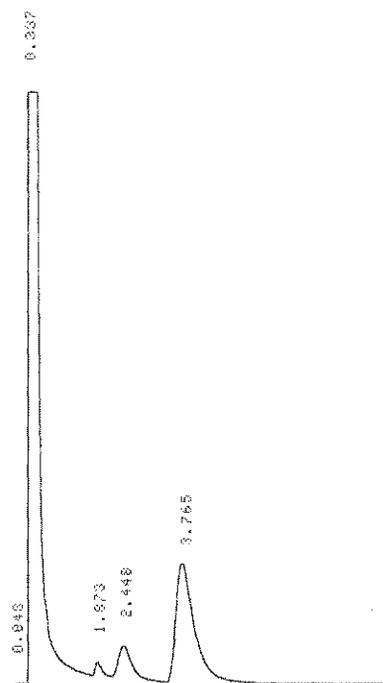


Figura 2 — Cromatograma da extração de uma amostra de pão de forma. Ácido butírico:  $Tr'$  = 3,765 — ácido propiônico:  $Tr'$  = 2,448, coluna DEGS.

Tabela 2. Teor de propionato e contagem de bolores e leveduras em amostras de pão de forma comercializados em Belo Horizonte

REGIONAIS	PROPIONATO (em ácido propiônico)		BOLORES E LEVEDURAS	
	Nº DE AMOSTRAS	MÉDIA (%) DP	Nº DE AMOSTRAS	MÉDIA (UFC/g)*
Barreiro	13	0,12 ± 0,05	13	1,5 x 10 <sup>3</sup>
Centro Sul	41	0,13 ± 0,07	40	2,0 x 10 <sup>3</sup>
Leste	28	0,13 ± 0,05	28	1,2 x 10 <sup>3</sup>
Nordeste	32	0,15 ± 0,08	31	1,2 x 10 <sup>3</sup>
Noroeste	28	0,11 ± 0,05	28	2,8 x 10 <sup>3</sup>
Norte	05	0,13 ± 0,07	05	6,2 x 10 <sup>3</sup>
Oeste	12	0,20 ± 0,10	12	2,4 x 10 <sup>3</sup>
Pampulha	08	0,12 ± 0,06	08	2,1 x 10 <sup>3</sup>
Venda Nova	24	0,12 ± 0,05	24	4,4 x 10 <sup>3</sup>
Total	191		189	

\*As amostras mofadas não foram consideradas para o cálculo da média (uma da regional Leste, Nordeste e Venda Nova).

Quanto à contagem de bolores e leveduras, pode-se dizer que não houve diferença entre as regionais. A tabela 3 mostra o percentual de amostras que apresentaram resultados acima do permitido pela legislação. Das 191 amostras, três foram condenadas, pois estavam visivelmente mofadas (uma da regional Leste, Nordeste e Venda Nova), o que tornou desnecessária a análise microbiológica. Outras duas não tiveram resultado conclusivo porque houve crescimento de colônia invasora o que impossibilitou a contagem. Portanto o resultado médio para bolores e leveduras considerando 186 amostras foi de  $1,7 \times 10^3$  UFC/g com um percentual de 12,70 de condenação. Em relação às marcas, foram analisadas um total de 23 marcas comerciais diferentes que foram denominadas de A a X e 24 amostras não possuíam marca e foram reunidas no grupo designado de Z. As tabelas 4 e 5 mostram os resultados encontrados por marca analisada.

Em relação ao teor de propionato, para uma mesma marca, houve, uma variação grande nos resultados, prin-

cipalmente naquelas amostras agrupadas como sem marca (Z) e nas de marca T.

Foram analisadas quanto ao teor de umidade, 44 amostras de pão de forma, das quais 35 (79,55%) apresentaram resultado acima do limite máximo permitido (30%p/p). Das 12 amostras de pão integral e/ou ceiteio, apenas uma (8,33%) apresentou resultado acima do limite (35%p/p) (BRASIL, 1978). O teor médio de umidade para as 44 amostras de pão de forma analisadas foi de 32,00%.

As análises foram feitas dentro do prazo de validade e foi observada uma grande variação nestes prazos até mesmo em produtos de uma mesma marca e tipo de pão. Em muitas das amostras nas quais foi encontrado pouco ou nenhum propionato o prazo de validade estabelecido era menor do que nas marcas de maior porte, as quais utilizam propionato em maior quantidade.

Foi realizado o teste do Quiquadrado para estabelecer a relação entre teor de umidade e crescimento de bolores e leveduras. Observou-se que nas classes pouco (< 2.500 UFC) médio (2.501 a 5.000 UFC) e muito (>

Tabela 3. Resultados de teores de Propionato e Bolores e Leveduras em relação à Legislação Brasileira

REGIONAL	*PROPIONATO				**BOLORES E LEVEDURAS			
	AP	CD	%CD	TOTAL	AP	CD	%CD	TOTAL
Barreiro	12	01	7,69	13	12	01	7,69	13
Centro Sul	35	06	14,63	41	34	06	15,00	40
Leste	25	03	10,71	28	25	03	10,71	28
Nordeste	26	06	18,75	32	27	04	12,90	31
Noroeste	28	00	0,00	28	23	05	17,86	28
Norte	04	01	20,00	05	04	01	20,00	05
Oeste	07	05	41,67	12	10	02	16,67	12
Pampulha	07	01	12,50	08	07	01	12,50	08
Venda Nova	23	01	4,17	24	23	01	4,17	24
TOTAL	167	24		191	165	24		189

\*Limite máximo = 0,200 % P/P

\*\* Limite máximo =  $5 \times 10^3$  (UFC/g)

AP = Aprovado

CD = Condenado

Tabela 4. Teores de propionato por marca analisada

MARCA	N. AMOSTRAS ANALISADAS	FAIXA (%)	MÉDIA (%)	% CONDENADAS
A	01	-	0,27	100,00
B	01	-	0,00	0,00
C	01	-	0,26	100,00
D	01	-	0,35	100,00
E	01	-	0,00	0,00
F	01	-	0,16	0,00
G	02	0,20 — 0,21	0,21	50,00
H	01	-	0,15	0,00
I	02	0,00 — 0,058	0,03	0,00
J	03	0,13 — 0,18	0,15	0,00
K	01	-	0,04	0,00
L	01	-	0,15	0,00
M	01	-	0,00	0,00
N	63	0,00 — 0,20	0,11	1,59
O	02	0,11 — 0,16	0,13	0,00
P	03	0,19 — 0,24	0,21	33,33
Q	01	-	0,00	0,00
R	06	0,02 — 0,18	0,14	0,00
S	33	0,06 — 0,20	0,12	0,00
T	34	0,00 — 0,32	0,19	52,94
U	01	-	0,00	0,00
V	07	0,12 — 0,27	0,18	28,57
X	01	-	0,00	0,00
Z	23	0,00 — 0,41	0,10	4,35

Tabela 5. Contagem de bolores e leveduras (UFC) por marca analisada

MARCA	N. AMOSTRA ANALISADA	FAIXA UFC/g	MÉDIA UFC/g*	% CONDENADOS
A	01	-	9,0	0,00
B	01	-	incontáveis	100,00
C	01	-	$1,2 \times 10^4$	100,00
D	01	-	$1,1 \times 10^4$	0,00
E	01	-	$1,5 \times 10^4$	100,00
F	01	-	$5,3 \times 10^2$	0,00
G	02	20,0 — $4,0 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	0,00
H	01	-	$4,0 \times 10^4$	0,00
I	02	-	9,0	0,00
J	03	9,0 — $1,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	33,33
K	01	-	$3,1 \times 10^4$	100,00
L	01	-	$2,0 \times 10^4$	0,00
M	01	-	$4,7 \times 10^3$	0,00
N	63	9,0 — $1,5 \times 10^4$	$8,9 \times 10^2$	6,35
O	02	9,0 — $1,0 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	0,00
P	02	9,0 — $2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	0,00
Q	01	-	$1,5 \times 10^4$	100,00
R	06	10,0 — incontáveis	$1,7 \times 10^2$	16,67
S	33	2,0 — $1,5 \times 10^4$	$8,5 \times 10^2$	6,06
T	33	1,0 — $7,2 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	0,00
U	01	-	$1,5 \times 10^4$	100,00
V	07	0,0 — $8,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	0,00
X	01	-	$8,5 \times 10^3$	100,00
Z	23	9,0 — incontáveis	$5,2 \times 10^3$	39,13

\*As amostras mofadas não foram consideradas para o cálculo da média (uma da regional Leste, Nordeste e Venda Nova).

Tabela 6. Teores médios de propionato, umidade e contagem de bolores e leveduras em amostras de pão de forma comercializados em Belo Horizonte

PROPIONATO		BOLORES E LEVEDURAS		UMIDADE	
MÉDIA	TOTAL AMOSTRA	MÉDIA	TOTAL AMOSTRA	MÉDIA	TOTAL AMOSTRA
$0,13 \pm 0,07$	191	$1,7 \times 10^3$	186	$32,68 \pm 2,82$	56

5.001UFC) o crescimento de fungos entre os limites de umidade  $> 30$  e  $\leq 30$  se distribuiu igualmente independente da umidade, fornecendo um resultado não significativo ao nível de 5%. Entre o teor de propionato e crescimento de bolores e leveduras o resultado também não foi significativo porque usando ou não propionato 86% das amostras apresentaram baixo crescimento. Isto era esperado pelo fato de as amostras terem sido analisadas dentro do prazo de validade dado pelo fabricante (GOMES, 1987).

## CONCLUSÃO

Em relação ao propionato, o resultado médio de 0,13% indica que ele tem sido utilizado de maneira correta. Porém, a grande variação dos resultados em uma mesma marca mostra a necessidade de uma padronização na adição deste aditivo pelos fabricantes. Esta padronização também se aplica ao prazo de validade que se apresentou desuniforme em relação às várias marcas.

RIALA 06/864

CAMPOS, G. *et al.* — Checking the state of conservation and use of propionic in loaf bread — Rev. Instituto Adolfo Lutz 58(2): 45-52, 1999

ABSTRACT: the use of propionic acid as a preservative in products such as chocolate, pickles, pastries and bakery goods is widespread because of its fungicidal properties. This acid is normally employed in form of its salts. A total of 191 samples of loaf bread were analyzed. The samples were collected from supermarkets and bakeries of the nine regions of Belo Horizonte. The propionic acid was extracted with ethyl ether in acid medium with quantification by gas chromatography using a flame ionization detector. Concurrently, the moisture and the counting of fungi and yeast was done. The analyses were executed during the period of validity of the products; a large variation in these periods was observed even among products of the same brand and type of bread. The mean propionate content encountered was 0,13%, expressed as propionic acid. The degree of condemnation was 12,56%, based on the brazilian legislation. A total of 12,70% of the samples presented fungi and yeast counts over the maximum limit. In the samples analyzed for moisture, 66% presented levels above the maximum limit of 35% w/w for whole wheat or rye bread or 30% w/w for others breads.

KEY WORDS: bread, propionate, preservatives.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D. C. Speck, M. L., APHA, 1984. 914pp.
2. BRASIL, Leis, Decretos, etc, Resolução nº 04 de 24 de novembro de 1988 do Conselho Nacional De Saúde, M.S, Diário Oficial, Brasília, p. 24716 — 24723, 24 de novembro 1988.
3. BRASIL, Leis, Decretos, etc — Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, Diário Oficial, Brasília, Seção 1 — parte 1 — 24 de julho de 1978
4. BRASIL, Leis, Decretos, etc. — Portaria 451 de 19 de setembro de 1997 da Vigilância Sanitária — Diário Oficial, nº 182— Seção 1, p. 21005-21012, de 22 de setembro de 1997.
5. CAMPOS, G. NELSON, D.; RIBEIRO-CUNHA, M. R.; FRANKLIN, H. O. H.; GOMIDES, M. F.; NAVEIRA, R. M. P.; PEIXOTO, T. M. G. Padronização de Metodologia para determinação de ácido propiônico em pães de forma. *Ciênc. Tec. Alim.*, 17 (2): 196-200, mai-ago, 1997.
6. DOORES, S. Organic Acids — antimicrobial in foods. In: *Food Science — A series of Monographs*. New York, Marcel Dekker Inc., 1983, cap. 4, p. 75-108.
7. FDA. Food and Drug Administration (21 cfr 184 — 1095) (Sec. 687.500 silage ingredients — CPG 7126.21).
8. FRAZIER, W. C. Microbiologia de los alimentos Acribia, Zaragoza, 1972, 512p.
9. GOMES, F. P. Curso de Estatística Experimental. Nob ed., 12 ed., Piracicaba, São Paulo, 1987, 467 p.
10. LYND SAY, R. C. Other desirable constituents of food. In: *principles of Food Science Part I. food Chemistry*, Fennema, O. R. ed. Marcel Dekker, New York, 1976.

11. SÃO PAULO — Instituto Adolfo Lutz — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz — Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3 ed. São Paulo, p. 189-197, 1985.
12. JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los Alimentos*. Acirbia, Zaragoza, 1973, 319 p.
- 13., ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. *Tratado de Microbiologia*. Manole, São Paulo, 1988, 186 p.

Recebido para publicação em 23/11/1998

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TESTES DE SOLUBILIDADE, FALCIZAÇÃO E GEL-CENTRIFUGAÇÃO PARA DETECÇÃO POPULACIONAL DA HEMOGLOBINA S.

Marilena OSHIRO\*  
Adelino POLI NETO\*  
Karen MIGUITA\*\*  
Cecília Ioshie WATANABE\*\*  
Delma Lúcia Biancardi PALHARINI\*\*

RIALA 06/865

OSHIRO, M.; POLI NETO, A.; MIGUITA, K.; WATANABE, C.I.; PALHARINI, D.L.B. – Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional da hemoglobina S. Rev.Inst. Adolfo Lutz,58(2): 53-56, 1999.

**RESUMO :** A Hemoglobinopatia S é considerada doença de saúde pública devido à sua morbidade e frequência. É o desenvolvimento de “screenings” é útil. Em 836 amostras de sangue periférico de gestantes foram realizados, o teste de solubilidade, o teste de falcização e o novo teste em gel-centrifugação (ID-Sickle Cell Test-DIAMED). 28 amostras foram igualmente positivas para Hb S nos três métodos utilizados sem discrepâncias, onde todos apresentaram a mesma especificidade e sensibilidade na detecção dessa hemoglobina. Entretanto, o teste da gel-centrifugação e o teste de solubilidade demonstraram rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de serem executados com pouco treinamento.

**DESCRITORES:** Solubilidade, Falcização, Gel-centrifugação, Hemoglobina S.

### INTRODUÇÃO

A hemoglobina S se diferencia das hemoglobinas normais por apresentar em sua estrutura a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta  $\beta_6$  Glu  $\rightarrow$  Val). Esta substituição faz com que em baixas tensões de oxigênio, a Hb S torne insolúvel e polimerize formando tactóides, levando a célula à forma de foice. Esses polímeros provocam rigidez e distorção dos eritrócitos, fazendo com que os mesmos sejam retirados da circulação pelas células retículo-endoteliais, diminuindo assim a sua vida média e, conseqüentemente o aparecimento de anemia hemolítica.<sup>1,16</sup>

Emmel<sup>5</sup> em 1917 descreveu a prova de falcização, modificada posteriormente por Daland e Castle<sup>4</sup> em 1948, em que as hemácias que contém a hemoglobina S adquirem a forma de foice em baixas tensões de oxigênio. E, baseado no fato da hemoglobina S ser insolúvel em altas concentrações de tampão fosfato, Itano<sup>9</sup> em 1953 desenvolveu o Teste de Solubilidade para HbS. Outras técnicas tem sido utilizadas na detecção de hemoglobinopatias, como HPLC (High Performance Liquid Chromatography)<sup>11,15</sup>; LPLC (Low Pressure Liquid Chromatography System)<sup>2</sup> e IEF (Isoelectric Focusing)<sup>12</sup>. Vários outros testes são comercializados em forma de kit<sup>1</sup>, entre elas o teste em gel-centrifugação, baseado no fenômeno da falcização “in vitro”.

\* Seção de Hematologia, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

\*\* Bolsista PAP/SES/FUNDAP, Seção de Hematologia, Instituto Adolfo Lutz.

O objetivo desse trabalho foi comparar o teste de solubilidade, o teste de falcização e o teste de gel-centrifugação na detecção de hemoglobina S.

### CASUÍSTICA E MÉTODOS:

Foram estudados, 836 amostras de pacientes de pré-natal, advindas de Centro de Saúde da cidade de São Paulo. O sangue foi coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA e analisados dentro de no máximo 3 dias, conservados a 4°C.

Cada um dos testes abaixo descritos foram realizados por pessoas diferentes e foram utilizados controles positivos e negativos para HbS.

#### 1. Teste de solubilidade<sup>13</sup>:

Princípio: O teste se baseia na insolubilidade da HbS no estado reduzido enquanto que outras hemoglobinas são insolúveis. É um teste que detecta apenas a HbS.

Interpretação: O teste é positivo quando a visualização das linhas negras traçadas no papel não são vista, devido a turvação da solução indicando a presença de HbS. O teste é negativo quando a visualização dos traços são bem visíveis. (Figura 1)

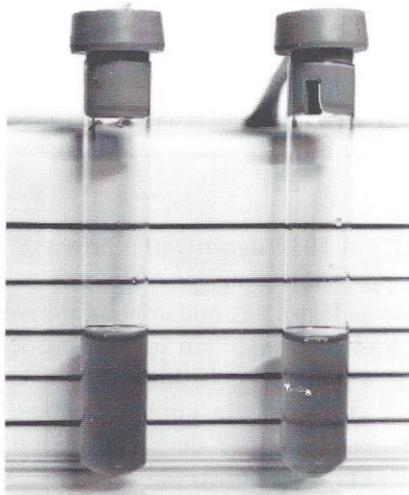


Figura 1 — Teste de Solubilidade para HbS

#### 2. Teste de falcização<sup>13</sup>:

Princípio: O metabisulfito de sódio reduz a tensão de oxigênio e quando adicionada ao sangue total em um compartimento totalmente vedado, as hemácias contendo HbS tendem à deformação celular característica de foice ou de meia-lua.

Interpretação: O teste é positivo quando há presença de hemácias em forma de foice ou de meia-lua. É negativo quando há ausência dessas deformações após 24 horas. (Figura 2)

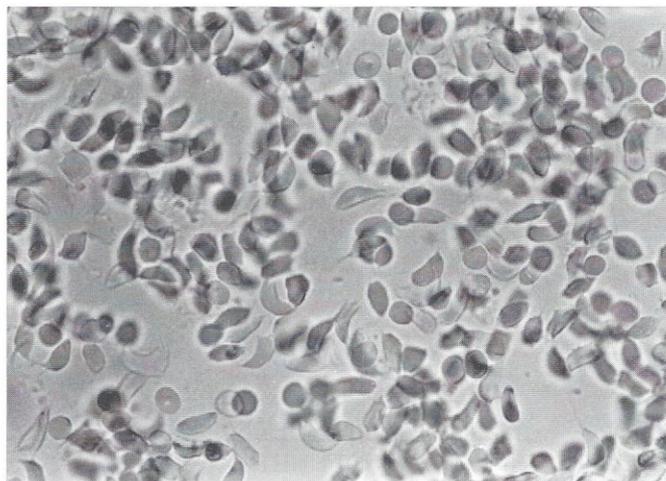


Figura 2 — Teste de falcização.

#### 3. Teste de gel-centrifugação ID-Sickle Cell Test (HbS).

Princípio: A solução tamponada contendo agente redutor, quando em contato com hemácias contendo HbS, estas células tornam-se rígidas impedindo a sua passagem pelo gel Sephadex, suspenso em microtubo, após centrifugação.

Interpretação: O teste é positivo quando, as células falcizadas são retidas no topo do micro-tubo ou espalhadas pelo gel. É negativo quando todas as células deslocam-se para o fundo do micro-tubo. (Fig.3.1 e 3.2)



Figura 3.1 — Teste em gel-centrifugação

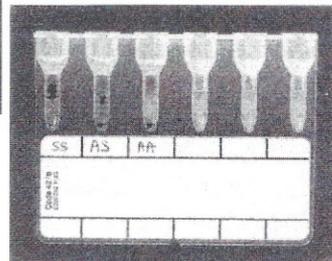


Figura 3.2 — Teste em gel-centrifugação

## RESULTADO:

Das 836 amostras, 28 amostras com hemoglobina S foram detectadas igualmente pelos três métodos utilizados, sem discrepâncias. Todos apresentaram a mesma especificidade e sensibilidade na detecção dessa hemoglobina que revelaram a prevalência de 3,5%, dado semelhante ao encontrado em nosso laboratório em 1995 por Gushiken e col.<sup>7</sup>

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Diversos estudos populacionais de hemoglobinas anormais tem sido realizados em diversas regiões brasileira e tem sido encontradas prevalências variáveis que variam de 2 a 11% de acordo com o grau de miscigenação étnica, com predominância das variantes S e C, ambas consideradas de maior relevância em termos de Saúde Pública, devido a sua morbidade e frequência.<sup>7</sup> Assim, a detecção precoce da HbS é importante para indicar medidas terapêuticas na prevenção de complicações da doença e no aconselhamento genético com o intuito de informar aos portadores, da possibilidade de transmissão aos seus descendentes.

O teste de solubilidade apresentou-se como método rápido (aproximadamente 10 min.) e de fácil identificação. Porém, alguns autores relataram resultados falso positivos em indivíduos com hemoglobina instável, com baixa concentração de Hb, com hiperproteinemia e resultado falso negativo em indivíduos AS que também é alfa-talassêmico.<sup>3,6,10</sup> Naoun<sup>14</sup> relata algumas precauções em relação à essa técnica, como por exemplo o uso de sais anidro e a necessidade de dobrar o volume da amostra em caso de hematócrito abaixo de 20%.

O teste de falcização apresentou-se como teste sensível para HbS provando ser um teste confiável,

desde que bem realizado e analisado por técnico treinado na observação de células falcizadas. A importância da concentração do reagente utilizado, o metabissulfito e o seu preparo momentos antes do uso, a vedação, tempo de reação, presença quantitativa de HbS e de Hb F são fatores que podem interferir na sensibilidade do método, segundo Naoun<sup>13</sup>. Mas, ele não é específico, porque o teste pode ter reação positiva para outras hemoglobinas que apresentam comportamento semelhante às HbS, como: HbC(Halem), e possivelmente HbAlexandra, HbC-Zigüinchor e HbS-Travis. Bunn e Forget<sup>1</sup> relatam que indivíduos heterozigotos (AS) com grave deficiência de ferro, a técnica pode falhar devido a diminuição da concentração intracelular de hemoglobina.

O teste do gel para HbS é um método que tem o mesmo princípio do teste de falcização. Observou-se que é um método rápido, específico e sensível. Entretanto, requereu alguns cuidados quanto à liofilização do reagente redutor, que exigiu água bidestilada e agitação gentil por inversão e na estabilidade por apenas duas horas após o preparo.

Todos os métodos utilizados apresentaram especificidade e sensibilidade na detecção de HbS. O teste em gel-centrifugação e o teste de solubilidade são mais práticas em relação ao teste de falcização, quanto à execução da técnica, a rapidez no resultado e do treinamento rápido e fácil do técnico. Todos são métodos de avaliações qualitativas e portando, quando positiva há necessidade da confirmação e as possíveis interações com outras hemoglobinas anômalas, que pode ser realizada através de eletroforese em tampão alcalino e ácido.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Prof<sup>o</sup> Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto da FMUSP pela orientação deste trabalho.

RIALA 06/865

OSHIRO, M.; POLI NETO, A.; MIGUITA, K.; WATANABE, C.I.; PALHARINI, D.L.B. — Comparative study among the test solubility, the sickling and the gel-centrifugation for detection of the hemoglobin S.

**ABSTRACT:** The hemoglobin S has been considered a public health disease due to its high frequency and morbidity. The development of screening methods is important to assist the clinic diagnosis and to help elaborate therapy measures. The peripheral blood of 836 samples were analyzed by the solubility test, the sickling test and the gel-centrifugation test. Twenty-eight samples were positive for hemoglobin S in the three tests analysed, disclosing the same sensibility and specificity for all of them. However, the solubility test and the gel-centrifugation method were faster than the sickling test, besides requiring short technician training period.

**KEY WORDS:** Solubility, Sickling, Gel-centrifugation, Hemoglobin S.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. BUNN, H.F. & FORGET, B.G. — *Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspect*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1986. cap.11-12.
2. CHAMBERS, K.; PHILLIPS, A. & CHAMPMAN, C.S. — Use of a low pressure liquid chromatography system for haemoglobinopathy screening. *Clin Lab Haematology*, 15(2): 119-28, 1993.
3. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. — *Practical Haematology* 8<sup>o</sup> ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1995, p.609.
4. DALAND, G.A. & CASTLE, W.B. — A simple method for demonstration sickling of red blood cells, the use of reducing agents. *J.Lab.Clin.Med.*, 33:1882, 1948.
5. EMMEL, V.E. — A study of the erythrocytes in a cases of severe anemia with elongated sickle shaped red blood corpuscles. *Arch. Intern. Med.*, 20:586,1917.
6. FAIRBANKS, V.F. & PETTIT, R.M. — Sickledex test in unstable hemoglobin disorders. *J.A. M. A.*, 220:128, 1972
7. GUSHIKEN, E.Y.; KITAMURA, C.; MIYAMARU-YOKOMIZO,R.; ZAMFIROV,V.M.C.; ARRUDA, I.C.; MUNHOZ, M.A.G.; CANGERANA-PEREIRA,F.A. & MARTINS, H.P. — Frequência de hemoglobinopatia S detectada no Instituto Adolfo Lutz-Central e sua importância em saúde pública. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 27(4):130-132, 1995.
8. HUISMAN, TH The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Clin Haematol.*, 6(1): 1-30, 1993.
9. ITANO, H.A. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobins. *Arch. Biochem. Biophys*,47:148, 1953.
10. KNAUS, J.S. & HAHN, D.A. — Homozygous alfa thalassemia causing a false negative solubility test in sickle cell trait. *Clin.Chem.* 27:1146, 1981.
11. LOREY, F.; CUNNINGHAM, G.; SHAFER, F.; LUBIN, B.& VICHINSKY, E.- Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 milion screens. *Eur. J.Hum.Genet.*, 2(4):262-71, 1994.
12. MONTENI, S.; FRISCHKNECHT, H.& THORMANN, W. Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. *Electrophoresis*, 15(1):22-30, 1994.
13. NAOUM, P.C. — *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo : Editora Sarvier, 1997. p. 171.
14. NAOUM, P.C. — *Eletroforese –Técnicas e Diagnósticos*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1990. p. 173 : cap.4.
15. VAN DER DIJS, F.P.; VAN DEN BERG, G.A. ; SCHERMER, J.G.; MUSKIET, F.D.; LANDMAN, H. & MUSKIET, F.A. — Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC. *Clin.Chem.*, 38(9):1864-9, 1992.
16. VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F. & WENDEL NETO, S. — *Hematologia e Hemoterapia* — Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. In: VERRASTRO, Therezinha. Principais tipos clínicos de anemia. São Paulo: Atheneu, 1996. 303 p. p. 68-69.

Recebido para publicação em 04/12/1998

## AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE OGAWA — KUDOH PARA O ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS

Andréa G. V. COELHO \*  
Liliana A. ZAMARIOLI \*  
Marilice P. VICENTE\*  
Regina Ruivo FERRO E SILVA\*\*

RIALA 06/866

COELHO, A. G. V. et al. — Avaliação do método de Ogawa — Kudoh para o isolamento de micobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 57-61, 1999.

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do método de descontaminação de Ogawa — Kudoh e a técnica de "swab" em meio de Ogawa (MOK), paralelamente à metodologia tradicional de Petroff em meio de Lowenstein — Jensen (MP) para o isolamento de micobactérias de espécimes clínicos de origem pulmonar e extrapulmonar. Foram analisadas 779 amostras de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacteriose. Destas, a positividade do MP foi de 13,96% e do MOK foi de 16,23% e a sensibilidade do MOK foi de 79% e a especificidade 94%. Observou-se ainda o crescimento das culturas mais rápido pelo MOK e uma menor contaminação. Pelos resultados obtidos, associados à simplicidade e baixo custo do método, o mesmo apresentou condições favoráveis de implantação na rotina laboratorial dos Laboratórios de Saúde Pública que apresentam escassos recursos humanos e materiais.

**DESCRITORES:** Micobactérias; Cultura; Método de Descontaminação

### INTRODUÇÃO

O aumento de casos de tuberculose, principalmente a partir de 1980, em consequência do impacto de fatores demográficos como crescimento populacional e envelhecimento da população, e fatores epidemiológicos como os efeitos adversos do vírus da imunodeficiência humana (HIV), além da deterioração dos serviços de saúde em alguns países, exige providências imediatas no combate à esta epidemia.

Estima-se hoje a nível mundial, a ocorrência de 88 milhões de casos novos de tuberculose, dos quais oito milhões são devidos à coinfeção HIV — TB, com uma

previsão de incidência global de 163 / 100.000 habitantes para o ano 2.000<sup>5</sup>.

O Estado de São Paulo apresenta por ano, 7000 casos novos e 600 óbitos, sendo uma região onde a doença continua a apresentar um quadro alarmante.

O Programa de Controle da Tuberculose (PCT) apresenta como objetivos a detecção precoce de casos novos e o aumento efetivo do tratamento dos casos infectantes para quebra da cadeia de transmissão da infecção<sup>1</sup>.

O método utilizado para o diagnóstico laboratorial da tuberculose é a bacilosopia, devido ao seu baixo custo e facilidade de execução<sup>9</sup>.

Apesar de contribuir para o PCT, esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade, 22 a 49% menor do que a

\* Instituto Adolfo Lutz — Laboratório I de Santos — Área de Micobactérias

\*\* Instituto Adolfo Lutz — Laboratório I de Santo André — Área de Micobactérias

cultura, e impossibilita o isolamento da micobactéria, o que inviabiliza a identificação e o estudo da resistência frente aos atuais quimioterápicos <sup>7,19</sup>.

Os laboratórios mais especializados, como os da Rede Regional de Laboratórios de Tuberculose do Estado de São Paulo, além do exame direto, realizam a cultura, utilizando o método de Petroff (MP) para a digestão e descontaminação do escarro, com semeadura em meio Lowenstein — Jensen (LJ). Esta técnica laboratorial requer equipamentos específicos e área física maior para o seu desenvolvimento, o que reduz a sua utilização de maneira generalizada <sup>8,12,16</sup>.

Sendo assim, diante da necessidade de se ampliar a cobertura diagnóstica laboratorial da tuberculose pulmonar na Baixada Santista, com cinco municípios considerados prioritários no Plano de Ação Emergencial para o controle da tuberculose, elaborado pela Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária (CNPS) do Ministério da Saúde (Cubatão, Praia Grande, Guarujá, São Vicente e Santos ) e na região do ABCD ( Santo André, São Bernardo, São Caetano e Diadema) com três municípios prioritários (Diadema, Santo André e São Bernardo do Campo), avaliamos o método de descontaminação Ogawa-Kudoh <sup>2,6,11,13,14,15,18</sup>, que apresenta uma metodologia sensível, de fácil reprodutibilidade e de baixo custo, e que pode ser aplicada em laboratórios com escassos recursos materiais e humanos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisadas 779 espécimes clínicos, provenientes de 714 pacientes sintomáticos respiratórios e 65 de pacientes com suspeita de tuberculose extrapulmonar, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista e da região ABCD, no período de maio de 1996 a dezembro de 1997.

As amostras foram colhidas segundo as normas recomendadas pelo Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde (MS).<sup>8</sup>

## PROCEDIMENTOS BACTERIOLÓGICOS

Baciloscopia — foi realizado um esfregaço de cada espécime clínico e corado pelo método de Ziehl — Neelsen. No caso de lâmina positiva efetuou-se a contagem bacilar semi — quantitativa segundo o índice baciloscópico recomendado pelo MS <sup>7</sup>.

Cultura — foi colocado um volume de aproximadamente 3 ml do espécime clínico em um tubo de polipropileno de fundo cônico; introduziu-se o “swab” estéril que, através de movimentos rotatórios foi impregnado com o material. Este “swab” foi transferido para um tubo 18x180mm contendo aproximadamente 2,0 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 4% e incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos; em seguida processou-se a semeadura em dois tubos contendo meio de Ogawa modificado por Kudoh (MOK) <sup>6,13</sup>. O espécime clínico remanescente no tubo de polipropileno foi submetido à descontaminação pelo método de Petroff (MP) <sup>16</sup> e semeado em dois tubos contendo meio de Lowenstein — Jensen (LJ) <sup>6,8,13,18</sup>.

Os tubos foram incubados a 37 °C realizando-se a leitura dos mesmos na 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas de incubação. Não havendo crescimento nos tubos após 60 dias, as culturas foram consideradas negativas. As culturas positivas foram identificadas de acordo com as técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde, observando-se o tempo de crescimento, pigmentação das colônias e realização de provas bioquímicas <sup>3,4,8,10,20</sup>.

## RESULTADOS

A comparação entre os resultados das culturas processadas pelo MP e pelo MOK, encontram-se na Tabela 1. Ressaltamos que alguns critérios foram utilizados na

Tabela 1. Comparação entre os resultados positivos e negativos de culturas processadas pelas técnicas de descontaminação Petroff e Ogawa — Kudoh

		Técnica de Petroff		Total
		Positivo	Negativo	
Técnica de Ogawa-Kudoh	Positivo	78	36	114
	Negativo	20	568	588
Total		98	604	702

comparação das duas técnicas:- amostras contaminadas no MP ou no MOK foram excluídas de nossos resultados; — todas as amostras positivas no MOK em combinação com o MP foram consideradas verdadeiras positivas ; — todas as amostras positivas somente pelo MOK foram consideradas para estudo da sensibilidade e especificidade do método, falso positivas.

Efetuando-se cálculos estatísticos para a determinação dos valores de concordância entre os métodos obtve-se: 92% de concordância bruta, 74,3% concordância esperada e 69% de concordância ajustada (Kappa).

Analisamos a expressão de crescimento da micobactéria nos dois métodos em relação ao tempo, representado em dias (Figura 1).

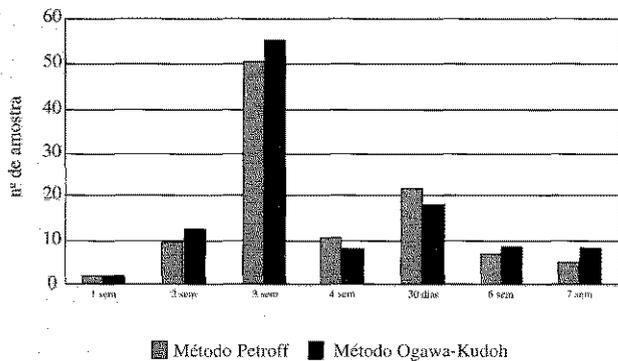


Figura 1 — Comparativo entre o tempo de crescimento das culturas, dos espécimes clínicos positivos, processados pelos Métodos de Ogawa — Kudoh e Petroff.

Comparando-se os dados da Tabela 2, verifica-se que os resultados obtidos pelos dois métodos são semelhantes no que se refere a positividade e mostra um maior índice de contaminação no método de Petroff. Na tabela 3 observamos as espécies isoladas em ambos os métodos.

Tabela 2. Positividade e contaminação das amostras processadas pelo Método de Petroff e Método de Ogawa — Kudoh

	n de amostras	Petroff		Ogawa-Kudoh	
		nº	%	nº	%
Contaminação	779	47	6	29	3,70
Positividade	702	98	13,96	114	16,24

Tabela 3. Espécies Isoladas nas culturas positivas pelo método de Petroff e método de Ogawa-Kudoh

	Método de Petroff		Método Ogawa-Kudoh	
	N	%	N	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	89	90,8	98	85,9
<i>Mycobacterium avium</i>	03	3,1	06	5,3
<i>Mycobacterium kansasii</i>	04	4,1	07	6,1
<i>Mycobacterium szulgai</i>	01	1,0	01	0,9
<i>Mycobacterium terrae</i>	01	1,0	01	0,9
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	00	00	01	0,9
Total	98	100	114	100

## DISCUSSÃO

A baciloscopia, representa o principal recurso diagnóstico da tuberculose, por demonstrar a presença do agente etiológico da doença e identificar os casos bacilíferos para serem tratados, acrescido de seu baixo custo e simplicidade. As limitações desta técnica<sup>6</sup> contudo, demandam a execução da cultura, uma vez que esta permite aumentar a cobertura diagnóstica além de possibilitar a realização de estudos sobre resistência, virulência e outras características do bacilo necessárias à avaliação e adoção de medidas para o controle da enfermidade.

Os instrumentos utilizados para o diagnóstico podem ser avaliados com base na sensibilidade, especificidade e custos . Para ser considerado adequado, o instrumento deve ter um nível aceitável de sensibilidade, especificidade e uma estimativa de custos que varia e serve de guia geral para a seleção do instrumento diagnóstico<sup>12</sup>.

No Brasil, pelas normas recomendadas pelo PCT recorre-se e restringe-se à técnica de Petroff com semeadura em LJ a apenas determinados casos<sup>8</sup>. Sendo assim, ainda que se faça necessária a realização da cultura de maneira ampla como a baciloscopia, encontram-se sérios impedimentos na utilização desse método em nosso país, devido a sua complexidade técnica e custos, os quais tornam inacessíveis aos Laboratórios e Regiões com escassos recursos materiais e humanos.

Verificamos que a técnica simplificada descrita por Kudoh & Kudoh, revelou resultados compatíveis com os já apresentados por outros autores como OROZCO VARGAS e colaboradores<sup>1,6,13,18</sup>, reforçando a idéia que a técnica simplificada MOK pode substituir o MP sem prejuízos para a busca de casos no PCT, ampliando dessa maneira a cobertura diagnóstica<sup>2</sup>.

A comparação entre os métodos revelou-nos, um índice de crescimento micobacteriano maior e mais rápido no MOK, talvez devido a uma melhor distribuição bacilar na superfície do meio através do processo de semeadura com "swabs", com a vantagem de uma menor contaminação e, satisfatória taxa de sensibilidade (79%) e especificidade (94%).

Devemos destacar, além dos aspectos descritos, outras vantagens oferecidas pelo método, como:

- O procedimento de descontaminação é simples e rápido, não necessitando de equipamentos e pessoal técnico especializado;
- A manipulação reduzida da amostra e a não utilização de mecanismos de agitação / centrifugação, favorece a execução da técnica em labora-

tórios de menor complexidade, reduzindo a produção de aerossóis e, conseqüentemente, a contaminação ambiental e do pessoal de laboratório; — Após semeado o meio pode ser mantido à temperatura ambiente por até 20 dias, aguardando seu envio ao Laboratório Regional para ser incubado.

Finalmente devemos referir que, mesmo não sendo um método recomendado pelo Ministério da Saúde, apresenta vantagens e condições favoráveis de implantação e aplicabilidade na rotina dos laboratórios com escassos recursos humanos e materiais.

#### AGRADECIMENTO

À Oficial de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica, Teresa de Ávila Ribeiro Figueiredo, e à Auxiliar de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica, Francisca Carrenho de Oliveira.

RIALA 06/866

COELHO, A. G. V. et al. -Evaluation of the Ogawa — Kudoh method for the isolation of mycobacteria. Rev. Instituto Adolfo Lutz, 58(2): 57-61, 1999

**ABSTRACT:** The purpose of this study was to evaluate the performance of the Ogawa — Kudoh decontamination and the Swab technique in Ogawa medium (OKM) compared to the traditional Petroff Methodology (PM) in Lowenstein — Jensen medium for the isolation of mycobacteria from pulmonary and extra-pulmonary clinical specimens. 779 samples from patients with clinical symptoms of pulmonary tuberculosis and/or mycobacterioses were studied. The positivity of PM and OKM was 13,96% and 16,24%, respectively. OKM showed a sensitivity of 79% and a specificity of 94%. It was also observed a faster culture growth in OKM, and a lower contamination rate. According to the results obtained, simplicity and low cost of the method, we believe that it might be implanted as a routine method in Public Health Laboratory which usually present scarce human and material resources.

**KEY WORDS:** Mycobacteria; Culture; Decontamination method

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. — FNG/ CENEPI/ CNPS/ Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Boletim de Pneumologia Sanitária. X Conferência Nacional de Saúde, 1996. Vol.04.
2. FILHO, A. F. — *Emprego da Técnica de cultura simplificada de Kudoh & Kudoh (1974) para diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar em Saúde Pública*. São Paulo, 1996 (Tese de doutorado, Faculdade de Saúde Pública da USP).
3. JAPAN. — Mycobacterioses Research Laboratory of the National Chubu Hospital Obu, Aichi 474. Tsukamura, M. *Identification on Mycobacteria*, 1984.
4. KENT, P.T. & KUBICA, G. P. — *Identification test techniques*. In: Public Health Mycobacteriology A guide for the Level III Laboratory. Centers for Control, Atlanta, p. 207, 1985.

5. KOCHI, A. ; DOLIN, P. J.; RAVIGLIONE, M.C. — Global tuberculosis incidence and mortality during 1990- 2000. *Bull Who*, 72 (21): 213 — 220, 1994
6. KUDOH, S. & KUDOH, T. — A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull Who*, 51 : 71 — 82, 1974.
7. LEVY, U.; FELDMAN, C.; SAEHO, U.; VAN DER MOULEN, H. ; KALLENBACH, J.; KOORNHOF, H. — A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnoses of pulmonary tuberculosis. *Chest*, 95 : 1193 — 1197, 1989.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose . Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional da Saúde, 1994.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose . Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 1980.
10. MITCHISON, D. A . — Bacteriology of tuberculosis. *Trop. Doct.*, 4: 147 — 143, 1974.
11. NASSAU, E. — Sputum swab culture: Simple method of isolation tubercle bacilli from sputum. *Tubercle*, 39: 18 — 23, 1958.
12. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD — Control de la tuberculosis. Manual sobre métodos y procedimientos para los programas integrados. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, 1987.
13. OROZCO, L. C.; FRANCO, C. I. L.; BLANCO, E.G.; RAMOS, O .Q.; MORENO, A. I. U.- El cultivo de Esputo para el Diagnostico de la tuberculosis Pulmonar. *Biomédica*, 5 (1-2): 24 — 25, 1985.
14. OROZCO, L.C.; FRANCO, C.I.L.; BLANCO, E.G.; RAMOS, O .Q.; MORENO, A .I.U.- Uma modificacion al méodo de Kudoh para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*, 5 : 86 — 89, 1985.
15. OROZCO, L.C.; FRANCO, C.I.L.; RIVIERA, M.B. — El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar por cultivo de esputo en unidades de salud com recursos mínimos. *Biomédica*, 7: 35 — 36, 1987.
16. PETROFF, S. A . — A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle de bacilli directly from sputum and feces. *J. Exp. Med.*, 21:38, 1915.
17. RUFFINO, A. N. — Avaliação do excesso de casos de tuberculose atribuídos a infecção HIV / AIDS: ensaio preliminar. *Revista de Saúde Pública*, 29 (4): 279 — 282, 1995.
18. SUSEMIHL, M. A. A. de M. M. ; FERRAZO-LLI, L.; UEKI, S.Y.M.; GIMENEZ, D.G.; PALLACI, M. — Avaliação do Método Ogawa — Kudoh para o cultivo de micobactérias. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, 29 : 51 — 54, 1993.
19. TRIVELLATO, L.B. & FERNANDES, L.C. — Avaliação da eficiência dos dois métodos baciloscópicos no diagnóstico dos B.A .A .R., utilizando-se como padrão a cultura de escarro. *Revista Med.*, São Paulo, 19 (1): 1 — 4, 1986.
20. YATES, M.D.; POZNIAK, A.; GRANGE, J.M. — Isolation of Mycobacteria from patients seropositive for the human immunodeficiency virus (HIV) in South East England 1984-92. *Thorax*, 49: 990 — 995, 1993.

Recebido para publicação 04/03/1999

## DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM MEL FLORAL E MEL DE MELATO DE ALGUMAS REGIÕES DE MINAS GERAIS E DE SANTA CATARINA

Gisélia CAMPOS\*  
Giancarlo Ubaldo NAPPI\*\*  
Marcelo BASTOS\*\*\*  
Maria de Fátima GOMIDES\*  
Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA\*  
Kleber Eduardo BATISTA\*  
Regina Célia DELLA MODESTA\*\*\*

RIALA 06/867

CAMPOS, G. et al.- Determinação de açúcares em mel floral e mel de melato de algumas regiões de Minas Gerais e de Santa Catarina. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 63-70, 1999.

**RESUMO:** O mel de melato difere do mel floral em relação à sua composição em açúcares. A fim de verificar estas diferenças, foram analisadas 14 amostras de mel floral e 11 amostras de mel de melato e determinados os teores de frutose, glicose, sacarose, maltose, melezitose, erlose e rafinose por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. Foram testadas diferentes fases móveis para separar melezitose de erlose que são trissacarídeos presentes no mel. O mel de melato apresentou teor de glicose menor que o mel floral, o que foi estatisticamente confirmado pelo teste U de Mann-Whitney. A erlose estava presente em todas as amostras. Não foi detectada melezitose nas amostras de mel floral.

**DESCRITORES:** mel, mel de melato, açúcares, carboidratos

### INTRODUÇÃO

Para obter os nutrientes necessários ao seu organismo, as abelhas coletam pólen, néctar e melato. Este se refere às excreções, em forma de líquidos açucarados, de um grande número de espécies de homópteros que vivem como parasitas sugadores da seiva elaborada do floema das plantas. Donner (1977) analisou 490 amostras de mel floral e 14 de mel de melato dos EUA e encontrou os valores de 38,19% de frutose e 31,28% de glicose para o mel floral e 31,80% de frutose e 26,08%

de glicose para o mel de melato, afirmando ainda que o mel de melato possui maior teor de oligossacarídeos. De acordo com Donner (1977) e Siddiqui, (1970), melezitose é um trissacarídeo, característico do mel de melato, embora o trissacarídeo erlose também possa estar presente. Embora Belliardo e Buffa (1979), considerem a presença de erlose como característica de mel floral e Siddiqui, (1970) considere a melezitose como fator de diferenciação entre estes dois tipos de mel, White & Maher (1953) e Doner (1977), consideraram a possibilidade de existirem dois tipos de mel de melato: do tipo

\*Da Fundação Ezequiel Dias, Divisão de Bromatologia e Toxicologia, Serviço de Química Bromatológica, Rua Conde Pereira Carneiro nº 80 CEP 30.510-010 Belo Horizonte, MG.

\*\*Bolsista da FAPEMIG

\*\*\*Da Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23.020-070 Rio de Janeiro, RJ.

melezitose, que pode granular rapidamente e o do tipo erlose que não granula. Esta diferença é supostamente atribuída ao fato de que a abelha pode coletar exsudatos açucarados das plantas, que não passaram pelo corpo do inseto. Contrariamente, Belliardo & Buffa (1979) consideraram a presença de erlose como característica do mel floral. Os métodos para determinação de carboidratos em alimentos podem ser classificados em físicos, químicos, colorimétricos e enzimáticos. Os procedimentos enzimáticos e cromatográficos (físicos) são os mais comumente utilizados. Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência é o sistema mais utilizado para análise dos açúcares. Esta metodologia foi aplicada neste trabalho, com o objetivo de caracterizar o mel de algumas regiões de Minas Gerais e o mel de melato proveniente de Santa Catarina, visando a obtenção de uma metodologia eficiente que, aplicada isoladamente ou como suporte a outras metodologias seja eficiente para diferenciar mel floral de mel de melato.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Foram analisadas quatorze amostras de mel floral e onze amostras de mel de melato assim classificadas por Campos (1998) de acordo com os métodos de Kirkwood (1960) e White (1980). Dentre as amostras de mel de melato, quatro foram provenientes de Santa Catarina, de apiários localizados em meio à plantação de bracinga.

Determinação de frutose, glicose, sacarose, maltose, erlose, melezitose e rafinose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

— Equipamento: cromatógrafo Líquido composto de Injetor Waters com loop de 20 $\mu$ L e bomba da Waters; Coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> – PN 84038) 30cm x 3,9mm x 10  $\mu$ m; detector de Índice de Refração CG – 410 acoplado a sistema de registro computadorizado.

### Reagentes:

— Solução de padrões isolados e em mistura: pesou-se, cerca de 0,2000g de frutose marca Aldrich 99%, glicose marca Fluka — teor de pureza > 99,5%, sacarose marca Fluka — teor de pureza > 99,5%, maltose monohidratada marca Sigma, melezitose monohidratada marca Sigma, e rafinose sem especificação. Foi feita a transferência, quantitativamente, para balão de 100 mL com 50mL de água desionizada, e completado o volume com acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 2mg/mL.

— Solução padrão de erlose: o conteúdo do frasco (14 mg) foi transferido para um balão de 5mL com 2,5mL de água e 2,5mL de acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 2,8mg/mL.

— Fase móvel: acetonitrila / água, 75:25 ; fluxo 0,7 mL/min; 80:20; fluxo 2 mL/min e 0,7 mL/min.

Para separar os picos de melezitose e erlose e confirmar qual destes açúcares estava presente nas amostras que apresentaram picos com tempo de retenção na região destes dois padrões, foram feitos vários testes com soluções dos padrões de melezitose monohidratada marca Sigma e erlose marca Sigma teor de pureza de 97%:

Fase móvel acetonitrila / água nas proporções 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 com fluxos variando de 0,7 a 2 mL/min.

Fase móvel acetonitrila / água 80:20, contendo 0,1% de polietilenoglicol (Churms, 1996).

Fase móvel acetonitrila / água / metanol 80:15:5, com fluxo de 1 mL/min

— Soluções padrão em mistura e isolados contendo cerca de 0,2g /mL de erlose e melezitose.

— Preparo da amostra: pesou-se cerca de 5,0000g de amostra de mel em béquer de 50mL, transferindo-se com 25 mL de água para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com acetonitrila. Filtrou-se em papel de filtro qualitativo e em seguida em SEP-PAK C<sub>18</sub> lavado com água, em seguida metanol e água novamente.

— Técnica do padrão externo: os padrões foram injetados separadamente, para determinação dos tempos de retenção nas condições utilizadas. Em seguida foi feita a injeção da mistura padrão e introdução dos valores de concentração, para obtenção dos fatores de resposta. O cálculo foi feito comparando-se as áreas dos picos dos padrões e das amostras (AOAC, 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à determinação de açúcares por CLAE as curvas de calibração para os açúcares frutose, glicose, sacarose, maltose, melezitose e rafinose, injetados separadamente em concentrações que variaram de cerca de 0,2 a 0,6 mg/20  $\mu$ L, mostraram-se lineares e com r<sup>2</sup> que variou de 0,9933 a 0,9997. Os teores médios de frutose, glicose, sacarose, e maltose determinados por CLAE nas quatorze amostras de mel floral e 11 de mel melato assim classificadas de acordo com Kirkwood e White encontram-se na Tabela 1.

As quatro amostras de mel de melato, provenientes de Santa Catarina, foram as que apresentaram teores menores de glicose, que variaram de 17,36 a 23,3. Dentre todas as amostras, classificadas como mel de melato, algumas apresentaram teores menores de glico-

se, e outras não. Contudo, o resultado médio do teor de glicose das amostras de mel de melato foi menor que o das amostras de mel floral (Tabela 1), confirmado estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney (Tabelas 2 e 3) o que está de acordo com Bonvehi (1987) e Doner (1977) que encontrou valores de 26,08% de glicose para mel de melato e 31,28% para mel floral.

Em se tratando de misturas de mel floral com mel de melato, tanto a fonte floral quanto a presença de melato interferem no espectro dos açúcares.

Em relação à frutose, os resultados médios não variaram para os dois tipos de mel, sendo que Doner (1977) encontrou 31,80% de frutose para mel de melato 38,19% para mel de floral.

A sacarose não foi detectada em sete das vinte e cinco amostras analisadas e os resultados encontrados tanto para sacarose quanto para maltose, variaram bastante independente do tipo de mel. Doner encontrou 0,80% de sacarose para mel de melato e 1,31% para mel floral; 8,80% de maltose para mel de melato e 7,31% para mel

floral. Para alto açúcares o mesmo autor encontrou 4,70% para mel de melato e 1,50 % para mel floral. Nas condições em que foram feitas as análises, os açúcares melezitose e erlose apresentaram tempo de retenção muito próximos, dificultando a interpretação dos cromatogramas.

Então, diminuiu-se o fluxo para 1mL/min. para melhorar a separação. Nestas condições a erlose apresentou um tR' de 27,70 e a melezitose de 29,257. A Amostra 22 injetada nestas mesmas condições, apresentou um pico em 28,009 que foi considerado como erlose. A amostra nº 5, também injetada nestas mesmas condições apresentou pico com tR' de 28,318, indicando a presença de erlose. Porém, houve alargamento do pico, o que dificultou a interpretação. As Figuras de 1 a 8, mostram os cromatogramas obtidos a partir de padrões dos açúcares pesquisados no mel e de amostras de mel floral e de mel de melato.

Dos testes realizados para confirmar a presença de erlose ou melezitose nas amostras que apresentaram pico com tempo de retenção na região destes padrões, somente a adição de metanol à fase móvel proporcionou uma

Tabela 1. Teores médios de açúcares determinados por CLAE em 14 amostras de mel floral e 11 de mel de melato classificadas de acordo com os critérios de Kirkwood e White

	Frutose %	Glicose %	Sacarose %	Maltose %
Mel Floral de acordo com Kirkwood				
Média	38,03	34,75	0,94	2,69
S	6,09	4,07	1,25	1,09
Faixa	21,11 - 47,40	30,15 - 45,50	0,00 - 3,81	1,50 - 4,25
Mel floral de acordo com White				
Média	37,51	34,67	0,624	2,645
S	5,79	4,04	0,87	1,48
Faixa	21,11 - 47,40	30,15 - 45,50	0,00 - 3,81	1,50 - 4,25
Mel de melato de acordo com Kirkwood				
Média	36,91	29,07	1,40	1,37
S	3,34	7,51	1,29	2,98
Faixa	21,11 - 47,40	30,15 - 45,50	0,00 - 3,81	1,50 - 4,25
Mel de melato de acordo com White				
Média	37,56	29,16	1,80	3,40
S	4,06	7,60	1,40	2,74
Faixa	42,64 - 45,94	17,36 - 38,60	0,00 - 3,81	0,32 - 7,27

separação dos picos melezitose e erlose, tornando possível verificar qual destes açúcares estava presente nas amostras (Tabela 4). Os cromatogramas das figuras 7 e 8 mostram claramente a presença de erlose. A amostra nº 4 apresentou pico maior na região da erlose mas apresentou um pico pequeno correspondente à melezitose. Portanto, o teor de 1,02 (Tabela 4) corresponde a erlose mais melezitose. Já as amostras 12, 17 e 19 não apresentaram nenhum destes dois açúcares.

Das amostras analisadas quanto à rafinose, foi constatada a presença deste açúcar nas amostras 20, 23 e 25. Sua presença nos dois tipos de mel significa que este açúcar não é indicativo de mel de melato.

A análise de açúcares por CLAE possibilitou verificar a presença de erlose no mel de melato, estando de acordo com White (1963) e Doner (1977) quan-

do eles sugerem que há mel de melato do tipo erlose e do tipo melezitose. Stefanelli *et al.* (1989) não considerou a melezitose como fator de diferenciação do mel floral do mel de melato porque encontrou este açúcar em ambos os tipos de mel. Porém não utilizou padrão de erlose sendo que nas condições analíticas empregadas, a erlose se presente, sairia junto com a melezitose. No presente trabalho, melezitose não foi detectada em nenhuma amostra de mel floral, somente em pouca quantidade em duas amostras de mel de melato. Isto está de acordo com Bacon & Dickson (1957) que relatam que a melezitose não é produzida pelas abelhas, mas pelos afídeos os quais possuem atividade transglucosilase, capaz de converter sacarose em melezitose.

Tabela 2. Teores de glicose em mel floral e mel de melato classificados de acordo com Kirkwood para aplicação do teste U de Mann-Whitney

Número da amostra mel floral (B)	% Glicose	Classe	Número da amostra mel de melato (A)	% Glicose	Classe
1	36,06	19	4	22,16	3
2	39,84	23	5	23,3	4
3	45,63	24	6	36,95	21
9	33,51	12	7	27,69	5
11	35,36	16	8	38,79	22
14	30,96	9	10	35,18	15
16	30,15	8	12	35,65	18
17	30,96	9	13	34,52	14
18	33,45	11	15	28,09	7
19	34,34	13	22	17,36	1
20	31,94	10	23	20,20	2
21	35,56	17			
24	36,58	20			
25	28,08	6			
Total		197			112

Cálculo pela Fórmula (Levin, 1987)

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + n_2)}{2} - P_1 = 108$$

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + n_2)}{2} - P_2 = 23$$

$U_0 = 23$   $H_0$ : Tratamento A = tratamento B

$U_c = 40$

Rejeitar  $H_0$  sempre que  $U_0 < U_c$

Conclusão: os resultados são estatisticamente diferentes.

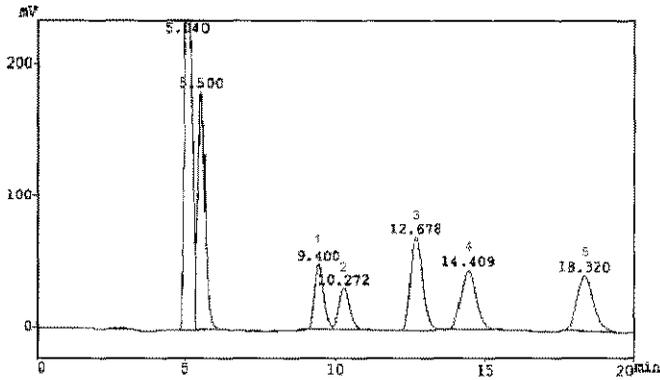


Figura 1 — CLAE de mistura dos padrões de frutose (1), glicose (2), sacarose (3), maltose (4), melezitose (5) — fase móvel acetonitrila: água 75:25, fluxo 0,7 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR.

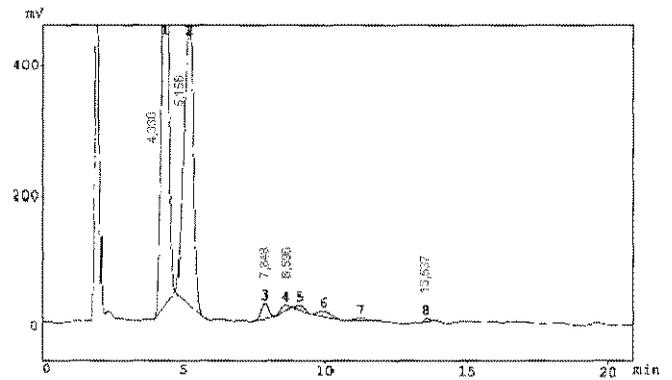


Figura 4 — CLAE de mel classificado como mel floral (amostra n° 16), 1-frutose, 2-glicose, 3-sacarose, 5-maltose, fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

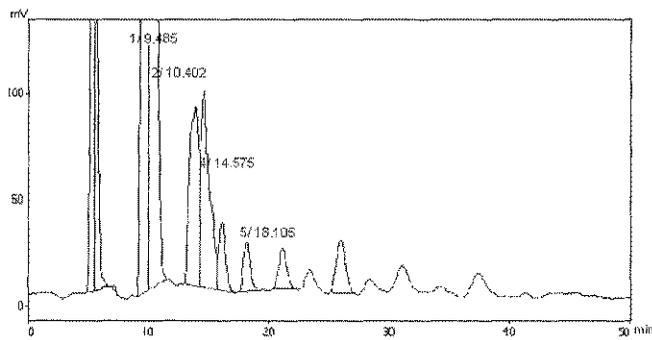


Figura 2 — CLAE de amostra de mel de melato (n° 4) — fase móvel acetonitrila: água 75:25, fluxo 0,7 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

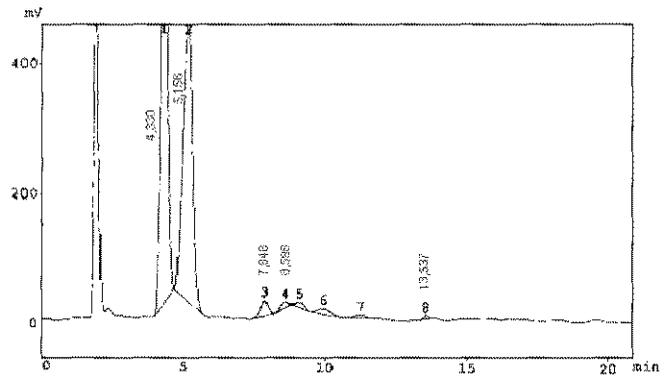


Figura 5 — CLAE de mel classificado como mel melato (amostra n° 13), 1-frutose, 2-glicose, 4-sacarose, 6-maltose, 9-erlose, fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

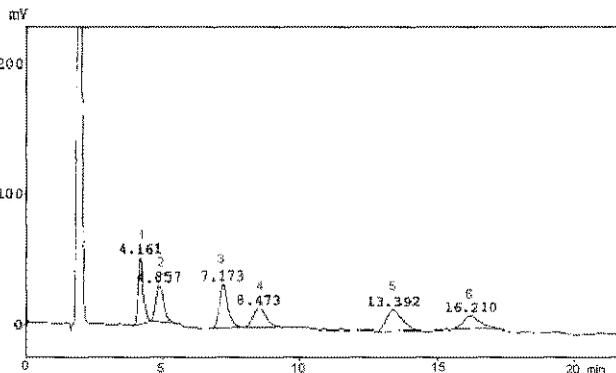


Figura 3 — CLAE de mistura dos padrões de frutose (1), glicose (2), sacarose (3), maltose (4), melezitose (5), rafinose (6), fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR.

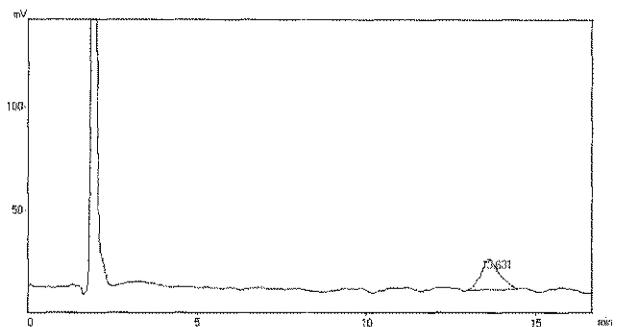


Figura 6 — CLAE de padrão de erlose, fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH<sub>2</sub> — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR



Tabela 4. Teores de erlose, melezitose e rafinose em amostras de mel determinados por CLAE

Amostra	Erlose %	Melezitose %	Rafinose %
1	0,11	ND	NE
2	0,17	ND	NE
3	0,26	ND	NE
4*	1,02	Presença	NE
5*	0,48	ND	NE
6*	3,07	ND	NE
7*	presença	ND	NE
8*	3,29	ND	NE
9	0,21	ND	NE
10*	0,34	ND	NE
11*	1,72	ND	ND
12*	ND	ND	ND
13*	1,93	ND	ND
14	0,11	ND	ND
15*	2,67	Presença	ND
16	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND
18	0,50	ND	ND
19	ND	ND	ND
20	0,10	ND	0,31
21	0,28	ND	ND
22*	2,89	ND	ND
23*	1,48	ND	1,13
24*	3,91	ND	ND
25	0,13	ND	presença

NE = Não Efetuado

ND = Não Detectado

\* Mel de melato de acordo com Kirkwood e/ou White

## CONCLUSÕES

A adição de metanol à fase móvel mostrou ser um recurso eficiente na separação dos trissacarídeos melezitose e erlose.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a presença ou ausência de erlose em ambos os tipos de mel não é um fator de distinção entre eles pois todas as amostras analisadas independentemente de ser mel de melato ou floral, apresentaram este açúcar.

O mel de melato apresentou teor menor de glicose em relação ao mel floral, estatisticamente confirmado pelo teste U de Mann-Whitney.

Melezitose, contudo, mostrou ser apenas um possível indicador da presença do mel de melato já que, apesar de presente em apenas duas amostras deste tipo de mel, não foi detectada em nenhuma amostra de mel floral. Sua presença indica mel de melato mas sua ausência não significa que não é mel de melato.

Frutose não é indicativo de mel de melato pois os teores não variaram com o tipo do mel.

Rafinose não é indicativo de mel de melato porque foi detectada em apenas três das quinze amostras analisadas, sendo duas mel floral e uma mel de melato.

De acordo com os resultados obtidos, a metodologia de CLAE mostrou-se adequada para a determinação do teor de glicose e da presença de melezitose que são fatores determinantes na diferenciação entre mel floral e de melato.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e à Agroindústria de Alimentos (EMBRAPA) pelo suporte técnico.

CAMPOS, G. et al — Sugar determination in floral honey and honey dew from regions of Minas Gerais and Santa Catarina. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(222): 63-70, 1999.

**ABSTRACT :** Honeydew honey differs of floral honey in sugar aspect. In order to check that, eleven honeydew honey and fourteen floral honey were analysed for fructose, glucose, sucrose, melezitose, erlose and raffinose by high performance liquid chromatography with refractive index detector. Different mobile phases were tested to separate melezitose from erlose, both are trisaccharides commonly found in honey. Honeydew honey presented less glucose content than honey and erlose was present in all honeydew honey. Melezitose was not detected in floral honey samples.

**KEY WORDS:** honey, honeydewhoney, sugars, carbohydrates

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13. ed. Washington D.C.
2. BONVEHI, J. S. Características físico-químicas. Composición de la miel de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) producida en España. *Anales de Bromatologia*, XLI-1, p.41-56, 1989.
3. BACON, J. S. D. & DICKSON, B. Biochem. J. 1957, 66, 289 apud DONNER, W. L. The sugars of Honey — A review *J. Sci. Food. Agric.* v. 28, p. 443 — 456, 1977.
4. BELLIARDO, F. & BUFFA, M. Identificación of melezitose and erlose in floral and honeydew honeys. *Carbohydrate Research*, v. 71, p.335 -338, 1979.
5. CAMPOS, G. Melado no mel e sua determinação através de diferentes metodologias: Belo Horizonte, Escola de Veterinária-UFMG, 1998, 178 p. (Tese de Doutorado em Ciência Animal).
6. CHURMS, S. C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. Review. *Journal of Chromatography*, v. 720, p. 75-91, 1996.
7. DONER, W. L. The sugars of Honey — A review *J. Sci. Food. Agric.* v. 28, p. 443 — 456, 1977.
8. KIRKWOOD, K. C., MITCHELL, T. J., SMITH, D. An examination of the occurrence of honeydew in honey. *Analyst*, v.85, p. 412-416, 1960.
9. LEVIN, J. *Estatística Aplicada a Ciências Humanas*. Editora Harbra, 2 ed. 391pp, 1987.
10. SIDDIQUI, I. R. The sugars of honey. *Adv. Carbohydr. Chem.* n. 25, p. 285 — 288, 1970.
11. STEFANELLI, C., NIOLA, I., VALLETRISCO, M. Possibilità di Diferenziazione del miele de melata da quello florale mediante HPLC. *Industria Alimentari*. v. 28, p. 138 — 140, Febbraio, 1989.
12. WHITE Jr., J.W. Detection of Honey Adulteration By Carbohydrate Analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 63, n.1, 1980.
13. WHITE Jr., J. W. "The Hive and the Honey Bee", R. A. Grout, ed, Dadant and Sorns, Inc., Hamilton, Illinois, 1963, p. 369. apud SIDDIQUI, I. R. The sugars of honey. *Adv. Carbohydr. Chem.* n. 25, p. 285 — 288, 1970.
14. WHITE Jr., J. W. & MAHER, J. (1953). Transglucosidation by honey invertase. *Archs. Biochem. Biophys.* 48: 360-367 apud LOW, N. H., NELSON, D. L., SPORNS, P. Carbohydrate Analysis of Western Canadian Honeys and their Nectar Sources to Determine The Origin of honey oligosaccharides. *Journal of Apicultural Research*, v.27, n.4, p. 245-251, 1988.

Recebido para publicação em 11.03.1999

## AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> EM MILHO

Simone Magda CAMARGOS  
Miguel MACHINSKI JUNIOR\*  
Lucia M. VALENTE SOARES\*\*

RIALA 06/868

CAMARGOS, S.M. et al.- Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B1 e B2 em milho. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 71-79, 1999.

**RESUMO:** Sistemas de extração e limpeza foram avaliados para determinação de fumonisinas em milho. O método descrito por Sydenham et alii (1992) apresentou a melhor limpeza. A recuperação encontrada, no entanto, estava abaixo de 50% para fumonisinas B1 e B2 (FB1 e FB2). O método foi modificado e a extração com metanol / água (3+1) foi mantida, os volumes de solvente no condicionamento e lavagem da coluna de troca aniônica forte foram aumentados para 10 mL e o volume e composição do solvente de eluição alterado para 20 mL metanol / ácido acético (95+5). Após estas modificações a recuperação elevou-se para a faixa de 93 a 96% para FB1 e 69 a 85% para FB2. O solvente de eluição por CLAE com detecção por fluorescência foi modificado para acetonitrila / água / ácido acético glacial (50+50+0,5) durante os primeiros 15 minutos com troca para acetonitrila pura até o final da corrida. As condições de derivação das FB1 e FB2 com o o-ftaldialdeído (OPA) foram também otimizadas empregando 100 L de extrato com 200 L do reagente OPA entre 5 — 15°C por 60 segundos. As novas condições melhoraram os limites de detecção para 20 e 40 ng/g para FB1 e FB2, respectivamente, e o desvio padrão relativo entre duplicatas para 0,6% para FB1 e 2,2% para FB2.

**DESCRITORES:** Micotoxinas, fumonisinas, milho, cromatografia líquida de alta eficiência.

### INTRODUÇÃO

As fumonisinas são toxinas capazes de causar leucoencefalomalácia equina (LEME)<sup>18</sup>, edema pulmonar e hidrotórax em suínos<sup>9</sup>, câncer hepático em ratos<sup>11</sup> e leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos<sup>5</sup>. Os altos níveis de uma destas toxinas (fumonisina B<sub>1</sub>) em milho, utilizado na dieta humana em algumas localidades da África do Sul e no norte da China, tem sido apontado como a possível causa da alta incidência de câncer de esôfago nas populações envolvidas<sup>8,27,29</sup>.

Esta família de toxinas é de descoberta recente e sua existência foi primeiro relatada em 1988<sup>11,12</sup> por um grupo de pesquisadores da África do Sul. São produzidas por cepas de *Fusarium moniliforme* Sheldon<sup>30</sup>, *F. proliferatum* Seção Liseola<sup>15</sup> e *F. nygamai*<sup>7</sup>. O milho tem sido o cereal mais implicado em contaminação por fumonisinas, tanto em frequência como em níveis. Realmente, o *F. moniliforme* e o *F. proliferatum* são invasores frequentes do milho em todo o mundo<sup>6</sup>.

Originalmente, BEZUIDENHOUT *et alii*<sup>4</sup> descreveram e caracterizaram quimicamente quatro metabóli-

\* Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Toxicologia. Av. Colombo, 5790. 87020-900. Maringá. Paraná.

\*\* Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. CP 6121 13081-970 — Campinas — São Paulo.

tos, as fumonisinas A<sub>1</sub> (FA<sub>1</sub>), A<sub>2</sub> (FA<sub>2</sub>), B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). A FB<sub>1</sub> é a mais importante do grupo, constituindo frequentemente até 70% do total das fumonisinas, produzidas tanto em cultivos, quanto em milho naturalmente contaminado.

O milho é o cereal mais produzido no Brasil<sup>14</sup> e o nosso país é o terceiro produtor mundial. Apesar disto a produção nacional não satisfaz as necessidades internas e grandes volumes de importação são realizadas. Algumas espécies de *Fusarium* já foram isoladas de milho, trigo, arroz e rações, procedentes de vários Estados brasileiros, em proporções variadas, com predominância de *F. moniliforme* e *F. graminearum*<sup>19</sup>. Segundo WENTZ *et alii*<sup>35</sup>, 90% das amostras de milho e de rações, para suínos e aves, por eles examinadas no Estado de Santa Catarina, estavam contaminadas com *Fusarium* spp. ASEVEDO<sup>3</sup> trabalhando com 90 amostras de milho procedentes de várias regiões do Brasil, encontrou *Fusarium* spp em 62,2% das amostras. CORREA *et alii*<sup>10</sup>, verificaram uma frequência de 85,1% de *F. moniliforme* em milho pós-colheita.

Informações sobre a incidência de fumonisinas em milho e produtos à base de milho brasileiros são raras na literatura científica. No entanto, as existentes mostram a importância do problema para o nosso país. Em trabalho realizado por SYDENHAM *et alii*<sup>25</sup>, foram analisadas 21 amostras de ração associadas a casos de micotoxicoses na região de Londrina, Paraná. Os resultados revelaram que 95,2% continham FB<sub>1</sub> e 85,7% continham FB<sub>2</sub>. Já HIROOKA *et alii*<sup>13</sup> investigaram 48 amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, das safras de 1990-1991. Das amostras analisadas, 97,4% apresentavam-se positivas para FB<sub>1</sub> e 94,8% para FB<sub>2</sub>. Um total de 4 amostras excederam a 10 µg/g, valor considerado crítico para o desencadeamento da LEME.

Devido ao amplo potencial de contaminação do milho e derivados com fumonisinas<sup>16,21,29,32,36</sup>, métodos analíticos que monitorem os níveis de fumonisinas nos produtos agrícolas são de grande interesse para analistas ligados a órgãos de fiscalização ou de pesquisa. Este fato é reforçado pelas necessidades de fiscalização do cereal e seus produtos originados interna ou externamente. É também possível que a escassez de informações sobre a incidência de fumonisinas, no Brasil, advenha exatamente das dificuldades encontradas no país com a metodologia analítica. Diante deste quadro os objetivos do presente trabalho foram: (1) avaliar um conjunto de técnicas já existentes relatadas na literatura e julgadas promissoras para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em milho; (2) uma vez escolhido o método analítico, proceder à sua otimização e adequação para as condições de trabalho encontradas em laboratórios brasileiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: amostras de milho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, São Paulo. As amostras foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 20 mesh e acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis à água. Foram mantidas a -18°C até o momento da análise.

Padrões de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: soluções estoques individuais de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila-água (1+1) segundo VISCONTI *et alii*<sup>34</sup>, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas em concentrações de 50 µg/mL de FB<sub>1</sub> e de FB<sub>2</sub>, respectivamente. Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

Fase móvel: as fases móveis testadas foram filtradas através de uma membrana HVLP 01300 de 0,45 µm de diâmetro (Millipore Corporation, Milford, MA) e degaseificadas em banho de ultra-som. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min.

Reagente de derivação: dissolver 40 mg de o-ftaldialdeído em 1 mL de metanol e diluir com 5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (dissolver 3,8 g de tetraborato de sódio em 100 mL de água deionizada e corrigir o pH para 10,4 com hidróxido de sódio 0,1 M), adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol e misturar. Estocar em frasco âmbar vedado com papel alumínio sob temperatura de 5 a 15 °C. Estável por uma semana.

Cromatógrafo à líquido: bomba (Waters Associates, Milford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc. M-7125 (Cotati, CA). Detector de fluorescência HP 1046 A (Hewlett Packard, Avondale, PA) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 335 e 440 nm e fenda espectral de 17 e 50 nm, respectivamente. Integrador HP 3393 A (Hewlett Packard, Avondale, PA). Coluna de fase reversa (250 mm x 4,6 mm da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS). Coluna de guarda da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com C<sub>18</sub> ODS (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL). Pré-coluna da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com sílica Sil-X-1 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

Otimização da separação cromatográfica das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: fases móveis com diferentes composições foram avaliadas através da resolução das toxinas, com padrões e posteriormente com amostras artificialmente contaminadas com 2 µg/g de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

Otimização da derivação da fumonisina B<sub>1</sub> com o-ftaldialdeído: a formação do derivado FB<sub>1</sub>-OPA foi estudada: (1) variando-se o tempo e temperatura durante a reação de derivação; (2) verificando a relação ótima

entre a concentração dos padrões e o volume do reagente de derivação. Foi realizada análise de variância dos dados obtidos.

Avaliação de sistemas de extração e limpeza: quatro sistemas de extração e limpeza foram avaliados quanto a sua eficiência usando-se amostras de milho artificialmente contaminadas. Foram avaliados os métodos de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA<sup>22</sup>, PRADO *et alii*<sup>17</sup>, ZOLLER *et alii*<sup>36</sup> e SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>. O primeiro sistema de extração e limpeza foi preconizado para aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A e esterigmatocistina e o segundo para aflatoxinas. Foram escolhidos para avaliação devido a características de praticabilidade e facilidade de emprego em laboratórios nacionais. A concentração de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> nas amostras enriquecidas de milho foi de 2 µg/g.

Avaliação de colunas de extração em fase sólida: as colunas de troca aniônica forte de 500 mg, Sep Pak QMA (Waters Associates, Milford, MA) e SAX (Varian, Harbor City, CA 90710) e a coluna de fase reversa Sep Pak C<sub>18</sub> (Millipore Corporation, Milford, MA) foram avaliadas quanto à eficiência de limpeza e quanto à recuperação de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em amostras de milho artificialmente contaminadas.

Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: vários aspectos com relação a técnica analítica foram avaliados, incluindo a recuperação de cada fumonisina individualmente, a linearidade da curva padrão, o limite de detecção do método e a repetibilidade da técnica. Para a recuperação, 50 g da amostra de milho, livre de fumonisinas, foram contaminadas com 2 µg/g dos padrões de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>. A linearidade da curva padrão foi determinada pela análise cromatográfica de padrões diluídos em concentrações decrescentes e submetidos a reação com o o-ftaldialdeído. O limite de detecção do método foi definido para nossas condições de trabalho, como a concentração das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> presente na amostra que originou um pico com uma área de  $1 \times 10^5$  mV. Esta área foi escolhida por ser a menor que permitia visualização inequívoca do pico. A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) do resultado da análise de 4 amostras de milho contaminadas artificialmente com 2 µg/g de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

Descontaminação do material: todo o material utilizado foi descontaminado com uma solução concentrada de hipoclorito de sódio comercial, por 24 horas. Após a descontaminação o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco em estufa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização das condições de eluição no cromatógrafo à líquido: Várias fases móveis foram estudadas para separar os derivados de fumonisinas-OPA das impurezas resultantes da derivação ou de interferentes provenientes do extrato da amostra em cromatógrafo à líquido. A melhor resolução para o pico de FB<sub>1</sub> foi conseguida com acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5) como fase móvel. Com a fase móvel escolhida, o tempo de retenção da FB<sub>1</sub> foi de 10,1 e o da FB<sub>2</sub> de 42,6 minutos. Após 15 minutos da injeção da amostra, o sistema solvente foi mudado para acetonitrila pura. E assim o tempo de retenção da FB<sub>2</sub> foi reduzido para 26 minutos. Os cromatogramas das soluções padrão de 50 µg/mL de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> e do extrato de milho naturalmente contaminado estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

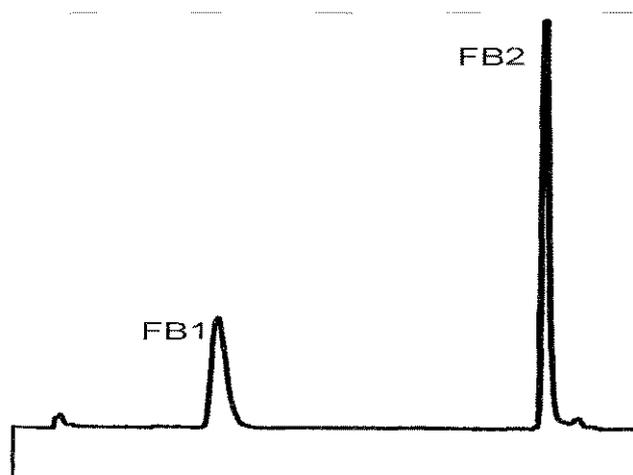


Figura 1 — Cromatograma das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (solução padrão com 50 µg/mL de cada).

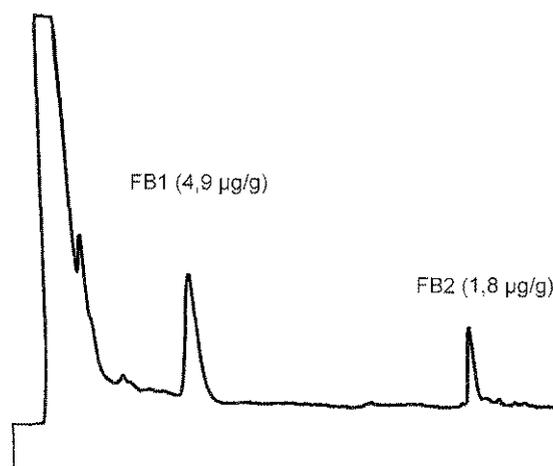


Figura 2 — Cromatograma de amostra de milho naturalmente contaminada com FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

Formação do derivado FB<sub>1</sub>-OPA: As fumonisinas não apresentam fluorescência e absorvem pobremente no ultravioleta/visível (UV/VIS). Assim sendo, uma reação de derivação é necessária para possibilitar a sua determinação por CLAE com detetor de fluorescência ou de absorvância no UV/VIS. A reação com marcador fluorescente tem sido favorecida por permitir limites de detecção (LD) mais baixos. Os reagentes propostos até agora tem sido fluorescamina (LD < 10 mg/kg), o-ftal-dialdeído (OPA, LD 50 ng/g), naftaleno — 2 — 3 dicarboxaldeído (NDA, LD 5 ng/mL, usado em leite), 4 — fluoro — 7 — nitrobenzofurazano (NBD-F, LD 100 ng/g) e fluorenilmetil cloroformato (FMOC, LD 200 ng/g)<sup>24</sup>. O OPA oferece como vantagens um custo muito inferior aos demais, exceto a fluorescamina, ser facilmente disponível e melhor limite de detecção. A reação com o OPA dá-se com grupos funcionais do tipo amina.

O derivado fumonisina OPA não é estável. Assim o efeito do tempo de reação na derivação das fumonisinas foi estudado. Para verificar qual seria o melhor tempo de reação, manteve-se o tempo de agitação inicial em 30 segundos e variou-se o tempo para injeção no cromatógrafo à líquido em 30, 45, 60, 90 e 120 segundos após o início da reação. O tempo de reação de 60 segundos antes da injeção da amostra apresentou intensidade máxima de fluorescência. No mesmo tempo de reação, a repetibilidade dos resultados foi a melhor (coeficiente de variação — 23,6%). Nos outros tempos de reação analisados houve maior variação e menor intensidade de fluorescência.

Para conseguir maior rendimento na formação do derivado fumonisinas-OPA, foram estudadas diferentes temperaturas de reação (5 a 30°C). A faixa de temperatura entre 5 — 15°C dá origem a picos com áreas maiores, possivelmente por melhorar a estabilidade do derivado evitando que se degrade rapidamente. Este resultado contraria os apresentados por THAKUR & SMITH<sup>25</sup> que verificaram não haver diferença significativa na estabilidade da fluorescência do derivado em temperaturas entre 4 a 25°C.

Para verificar a melhor relação entre a concentração e o volume da solução de fumonisinas, por um lado, e o volume do reagente de derivação OPA, por outro, foi utilizado um esquema fatorial com análise de variância. Foram analisados: concentração do padrão — 25 e 50 µg/mL; volume do padrão — 50, 100, 150 e 200 µL; e volume do reagente de derivação — 150, 200 e 250 µL. A condição ótima de trabalho foi obtida quando a concentração do padrão de fumonisinas foi a de 25 µg/mL, o volume do padrão 100 µL e o volume do reagente OPA de 200 µL.

Avaliação de sistemas de extração e limpeza:

Os métodos descritos por SOARES E RODRIGUEZ-AMAYA<sup>22</sup> E POR PRADO *ET ALII*<sup>17</sup>, não produziram uma limpeza adequada, apresentando grande quantidade de interferentes no cromatograma. O emprego de sulfato de amônio, em ambos os métodos, dá origem a um precipitado quando o extrato é re-suspendido em acetonitrila/água (1+1), para injeção em cromatógrafo à líquido. O uso de acetato de chumbo, no método de PRADO *et alii*<sup>17</sup>, pode, por sua vez, danificar a coluna analítica pela introdução de um metal pesado no sistema. O desengorduramento com isoctano foi acrescentado para remover os compostos lipossolúveis. A partição para clorofórmio, uma outra etapa do processo de limpeza, mostrou melhor recuperação das fumonisinas quando empregada sozinha e não quando precedida de desengorduramento com isoctano. No entanto, a recuperação das fumonisinas foi inadequada e inferior a 20% em todos estes casos e as etapas de uma maneira geral mostraram-se trabalhosas.

Tanto o método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>, como o de ZOLLER *et alii*<sup>36</sup>, apresentaram recuperações inferiores a 50%. A limpeza do método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>, no entanto mostrou menor número de interferentes. Por este motivo foi considerado mais promissor e modificações foram introduzidas no sentido de otimizá-lo. Este método, por outro lado, foi objeto de estudos colaborativos internacionais<sup>30,31</sup> e foi adotado pela AOAC International<sup>2</sup>.

Avaliação de colunas de extração em fase sólida: Os extratos, obtidos através dos quatro métodos sendo avaliados no presente trabalho, foram ainda submetidos a uma etapa de limpeza com colunas de extração em fase sólida. Foram testadas uma coluna de fase reversa tipo octadecilsilil (C<sub>18</sub>) (Tabela 1) e duas colunas de troca aniônica forte (Tabela 2).

A limpeza com coluna de fase reversa não foi eficiente, apresentando ainda vários interferentes no cromatograma. Durante a eluição das fumonisinas da coluna de C<sub>18</sub>, maiores recuperações foram obtidas quando o solvente de extração utilizado foi metanol/água (3+1), mas ainda assim insatisfatórias.

A limpeza com as colunas de troca aniônica forte (Tabela 2) apresentou melhores resultados do que com as colunas de octadecilsilil, mas ainda assim foi necessário introduzir modificações nos solventes de condicionamento e eluição com relação aos propostos no método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>. A limpeza com coluna de troca aniônica forte (500 mg) não produziu bons resultados uma vez que retinha 60% de FB.

O condicionamento das colunas foi otimizado alterando-se os seguintes parâmetros: volume das soluções de lavagem, força iônica, volume da solução e vazão de eluição. O aumento da força iônica, ou seja, metanol/ácido acético glacial (99+1) para (95+5) aumentou a

Tabela 1. Solventes testados com coluna de fase reversa tipo octadecilsilil, para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.

Condicionamento da coluna	Aplicação da amostra	Lavagem da amostra	Eluição das toxinas
5 mL metanol	10 mL em metanol/ água (3+1)	6 mL metanol/água 3 mL metanol	Metanol/água (3+1)
5 mL metanol	10 mL em metanol/ água (3+1)	10 mL em metanol/ água (3+1)	Metanol/ácido acético (99,5 + 0,5)

Tabela 2. Solventes testados com colunas de troca aniônica forte para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.

Condicionamento da coluna	Aplicação da amostra	Lavagem da coluna	Eluição das toxinas	Referências
5 mL metanol	1 mL em metanol/ água (3+1)	6 mL metanol/ água (3+1) 3 mL metanol	10 mL metanol ácido acético (99,5 + 0,5)	UENO <i>et alii</i> <sup>32</sup>
5 mL metanol 5 mL metanol/ água (3+1)	10 mL em metanol/ água (3+1)	5 mL metanol/ água (3+1)	10 mL metanol/ ácido acético (99+1)	SYDENHAM <i>et alii</i> 26
3 mL metanol 8 mL metanol 8 mL metanol/ água (3+1)	5 — 15 mL em metanol/ água (3+1)	8 mL metanol/ água (3+1) 5 mL metanol	10 mL metanol/ ácido acético 10 mL metanol/ ácido acético (99+1)	ZOLLER <i>et alii</i> <sup>36</sup>

Em todas as misturas metanol/água recomenda-se manter o pH entre 5,8 e 6,5.

recuperação das fumonisinas. Além disso, o uso de solvente com maior força iônica não resultou na co-eluição de interferentes cromatográficos. Adicionalmente, com o aumento da quantidade de eluente para 20 mL conseguiu-se recuperações de 72 a 87% de FB<sub>1</sub> e de 51 a 78% de FB<sub>2</sub> em coluna Sep Pak QMA e de 93 a 96% de FB<sub>1</sub> e de 69 a 85% de FB<sub>2</sub> em colunas SAX nas duas primeiras utilizações (Tabela 3). Já foi relatado que a recuperação das fumonisinas é substancialmente menor quando a vazão de eluição nas colunas está entre 2,5 para 6,7 mL/minuto, recomendando-se <sup>25</sup> vazões iguais ou menores que 1 mL/min. A necessidade de manter estas condições de eluição foram constatadas no presente trabalho.

A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de HCl 0,1 M seguidos de 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM *et alii* <sup>26</sup>. Nenhuma diferença significativa foi observada na recuperação das fumonisinas após regeneração das colunas. O mesmo foi constatado no presente trabalho (Tabela 3). Estes resultados sugerem que, se necessário, as colunas podem ser regeneradas e reutilizadas mais uma vez sem queda significativa na recuperação das fumonisinas.

A limpeza com colunas de C<sub>18</sub> é mais rápida, entretanto, as colunas de troca aniônica forte produzem frações mais limpas e o limite de detecção é menor. Numa intercomparação de métodos realizada entre 31 laborató-

Tabela 3. Recuperação das fumonisinas adicionadas a milho quando são usadas colunas de extração em fase sólida de troca aniônica forte de diferentes marcas em mais de uma utilização por coluna.

Marca da Coluna	Fumonisina	Recuperação (%)			
		1º uso	2º uso	3º uso	
Sep Pak	FB <sub>1</sub>		87	82	39
			86	73	
			80	73	
			77	75	
	FB <sub>2</sub>		78	59	22
			78	51	
				62	
				60	
SAX	FB <sub>1</sub>		96	94	62
			96	93	70
			95		
			96		
	FB <sub>2</sub>		70	84	56
			69	85	62
			72		

Nível de adição por fumonisina = 2 g/g

Demais condições analíticas conforme descrito nas Conclusões.

rios europeus, aqueles que usaram limpeza com colunas de C<sub>18</sub> relataram também mais interferentes e limites de detecção piores que aqueles que usaram colunas de troca aniônica forte<sup>33</sup>.

Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: A recuperação do método otimizado foi de 93 a 96% para FB<sub>1</sub> e de 69 a 85% para FB<sub>2</sub>. No estudo colaborativo do método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup> conduzido por AOAC-IUPAC, os 12 laboratórios envolvidos obtiveram recuperações de 81 a 84% para FB<sub>1</sub> e 76 a 82% para FB<sub>2</sub>. Já os resultados com laboratórios europeus, em estudo em que a metodologia era de livre escolha, as recuperações médias foram 70% para FB<sub>1</sub> e 69% para FB<sub>2</sub><sup>33</sup>. Segundo ALBERTS *et alii*<sup>1</sup> as recuperações mais baixas obtidas para FB<sub>2</sub> podem ser devido a diferença de polaridade em relação a FB<sub>1</sub> que resulta em uma perda de aproximadamente 20% durante a etapa de limpeza, em comparação com os 4% para FB<sub>1</sub>. As curvas padrão para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram lineares de 20 a 10000 ng/g e de

40 a 10000 ng/g, respectivamente, conforme apresentada na Figura 3.

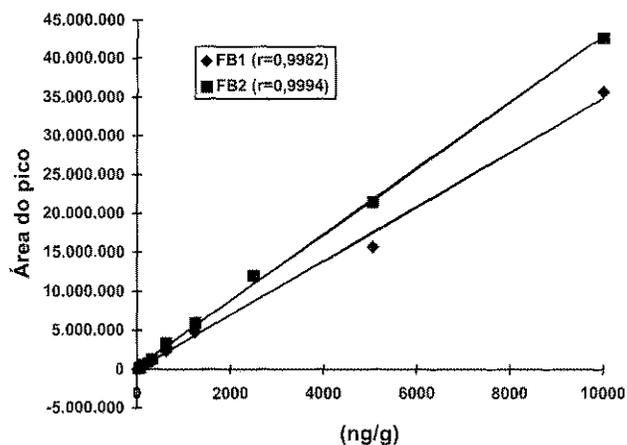


Figura 3 — Curvas padrão de FB1 e FB2.

Os limites de detecção do método foram de 20 e 40 ng/g para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente. SHEPHARD<sup>30</sup> revendo a literatura sobre o assunto dá como usual um limite de detecção da ordem de 50 ng/g para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 0,6 % para FB<sub>1</sub> e 2,2% para FB<sub>2</sub> para primeira ou segunda utilização das colunas de SAX. Resultados estes que comparam bem com os encontrados no estudo colaborativo AOAC — IUPAC onde os RSD internos dos laboratórios variaram entre 5,8 a 13,2% para FB<sub>1</sub> e entre 7,2 e 17,5% para FB<sub>2</sub><sup>35</sup>. No estudo europeu<sup>33</sup>, os valores médios de RSD foram de 10% para FB<sub>1</sub> e 11% para FB<sub>2</sub>.

### CONCLUSÕES

Método otimizado para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em milho: O método escolhido para determinação de fumonisinas em milho na etapa de avaliação foi o método de SYDENHAM *et alii*<sup>35</sup>. Modificações foram necessárias para aumentar a recuperação das toxinas e melhorar o limite de detecção. O método modificado está descrito a seguir:

Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 100 mL de metanol/água (3+1) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para 5,8-6,5 com hidróxido de sódio 1 M (somente 2 a 3 gotas).

A limpeza do extrato filtrado foi conduzida em colunas SAX com 500 mg de recheio. O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens com 10 mL de metanol, seguidos de 10 mL de metanol/água (3+1). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e lavados com 10 mL de metanol/água (3+1), seguidos por

6 mL de metanol. As fumonisinas foram então eluídas com 20 mL de metanol-ácido acético glacial (95+5). Todos os solventes foram passados pela coluna com uma vazão máxima de 1 mL/min a qual pode ser controlado com vácuo. O eluato foi evaporado a 60°C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo concentrado foi lavado com 1 mL de metanol e novamente evaporado para garantir que todo o ácido acético fosse evaporado. O resíduo seco foi mantido em freezer a -18°C até o momento da análise.

Os extratos das amostras de milho foram re-dissolvidos em 500 µL de acetonitrila/água (1+1) e filtrados em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro. Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA. Foi agitado em ultra-som, entre 5-15°C, durante 30 segundos e injetados 20 µL no cromatógrafo após 60 segundos do início da reação.

As fumonisinas foram separadas e quantificadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência usando uma fase móvel composta por acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5) durante 15 minutos e em seguida por acetonitrila pura. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Após a corrida foram necessários 30 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel composta por acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5), antes da próxima injeção.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo — FAPESP pelo suporte financeiro à realização de trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES, pela concessão das bolsas de estudo aos dois primeiros autores.

RIALA 06/868

CAMARGOS, S.M. et al. Evaluation of analytical methods and optimization of conditions for the determination of fumonisins B1 and B2 in corn.

**ABSTRACT:** Extraction and clean up systems were evaluated for the determination of fumonisins in corn. The best clean up was found in the method described by Sydenham *et alii* (1992). Recovery, nonetheless, was found to be below 50% for fumonisins B1 and B2 (FB1 and FB2). The method was modified and methanol/water (3+1) was kept as the extraction solvent, the volumes of the anionic exchange column conditioning and washing solvents were increased to 10 mL and both the volume and the composition of the eluting solvent were altered to 20 mL methanol/acetic acid (95+5). After these modifications were introduced the method recovery was 95 to 96% for FB1 and 69 to 72% for FB2. The elution solvent for the HPLC with fluorescence detection step was also modified to acetonitrile/water/acetic acid (50+50+0,5) during the first 15 minutes followed by pure acetonitrile for the rest of the run. The conditions employed during the derivatization reaction of fumonisins with o-phthalaldehyde (OPA) were also optimized to utilize 100 L sample extract and 200 L OPA solution at 5 — 15 °C during 60 seconds. The new conditions improved the detection limits to 20 and 40 ng/g for FB1 and FB2, respectively, and to an average standard deviation between duplicates of 0,6% for FB1 and for FB2.

**KEY WORDS:** Mycotoxins, fumonisins, corn, high performance liquid chromatography.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16ª Edição, 3ª Revisão, Gaithersburg, M.D., 1997.
3. ASEVEDO, I.G. *Estudo da microbiota fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por Aspergillus flavus Link, 1809 em amostras de milho provenientes de silos*. São Paulo, Dissertação de Mestrado — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1988.
4. BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G. & VLEGGARR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 11: 743-745, 1988.
5. BUCCI, T.; HANSEN, D.K. & LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin *Fumonisin B<sub>1</sub>*. *Nat. Tox.*, 4: 51-52, 1996.
6. BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: *Fumonisins in Food*, New York, Jackson, L.S.; DeVries, J.W.; Bullerman, L.B. (eds.), 1995, p. 27 — 38.
7. BURGESS, L.W. & TRIMBOLI, D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. *Mycologia*, 78: 223-229, 1986.
8. CHU, F.S. & LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 847 — 852, 1994.
9. COLVIN, B.M. & HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathol.*, 117: 79-82, 1992.
10. CORREA, B.; POZZI, C.R.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. & CHACON-RECHE, N.O. Postharvest and stored corn in Brazil. Mycoflora, interation abiotic factors, and mycotoxins occurrence. *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, Mexico City, Livro de Resumos, 1992, p. 123.
11. 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.
12. GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O.; VLEGGARR, R.; THIEL, P.G. & CAWOOD, M.E. — Fumonisins: isolation, chemical, characterization and biological effects. *Mycopathol.*, 117: 11-16, 1992.
13. HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y. & UENO, Y. — The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Add. Contam.*, 13: 173-183, 1996.
14. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Anuário Estatístico do Brasil*, Rio de Janeiro, 1996.
15. NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. & MARASAS, W.F.O., *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. State College, Pa., 1983, 203 p.
16. PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M. & GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Add. Contam.* 14: 187 — 191, 1997.
17. PRADO, G.; LEITE, M.P.M.B. & NICÁCIO, M.A.S. Estudo comparativo de métodos analíticos para quantificação de aflatoxinas em ração animal. *Bol. SBCTA*, 27: 9-13, 1993.
18. 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. Diag. Investig.*, 5: 69-74, 1993.
19. SALGADO, J.M. & CARVALHO, P.C.T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I — Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. *Rev. Microbiol.*, 11: 60-63, 1980.
20. SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J. Chromatogr.* 815: 31-39, 1998.
21. SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S. & SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contaminated of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.*, 79: 671-687, 1996.
22. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods, utilizing a multi-toxin thin layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 22-26, 1989.
23. SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. & HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected

- animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 994-997, 1992.
24. SYDENHAM, E.W. & SHEPHARD, G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. London, Gilbert, J. (ed), *Progress in Food Contaminat Analysis*, 1996, p.65 — 146.
25. SYDENHAM, E.C.; SHEPHARD, G.S. & THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> in foods and feeds. *J. AOAC Int.*, 75: 313-318, 1992.
26. SYDENHAM, E.C.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W. & VAN SCHALKWYK, D.J. — Liquid Chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, 79: 688-696, 1996.
27. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; VAN 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: 1900 — 1903, 1990.
28. THAKUR, R.A. & SMITH, J. S. Determination of fumonisins B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 44:1047-1052, 1996.
29. 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.
30. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. & NIEUWENHUIS, J.J. Survey of fumonisin production by Fusarium species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1089-1093, 1991.
31. THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.C.; SHEPHARD, G.S. & Van SCHALKWYK, D.J. — Study of the reproducibility characteristics of a Liquid Chromatographic method for the determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn: IUPAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, 76: 361-366, 1993.
32. UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D.S.; LEE, U.S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G. & YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.*, 9:, 27-34, 1993.
33. VISCONTI, A. ; BOENKE, A. ; SOLFRIZO, M.; PASCALE, M.& DOKO, M.B. European intercomparison study for the determination of the fumonisins content in two maize materials. *Food Add. Contam.* 13: 909 — 927, 1996.
34. VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B. & BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. *Food Add. Contam.*, 11: 427-431, 1994.
35. WARE, G.M.; FRANCIS, O. ; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN, A. & CARTER, L. Determination of fumonisin B1 in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Lett.*, 26: 1751 — 1770, 1993.
36. WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SOBESTIANSKY, J.; SANTOS, C.R.M. & REES, U. Fusariotoxicoses e estrogenismo em suínos. *Comunicação Técnica CNPSA/EMBRAPA*, 24: 1-3, 1981.
46. ZOLLER, O.; SAGER, F. & ZIMMERLI, B. Vorkommern von fumonisin in Lebensmitteln. *Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg.*, 85.: 81-99, 1994.

Recebido para publicação em 16.03.1999

## AValiação DO TEOR DE ARSÊNIO TOTAL EM PESCADO DE ÁGUA DOCE

Lúcio Flávio Costa MELO<sup>1</sup>  
Marcelo Antonio MORGANO<sup>2</sup>  
Dilza Maria Bassi MANTOVANI

RIALA 06/869

MELO, L.F.C.; MORGANO, M. A. & MANTOVANI, D.M.B. Avaliação do teor de arsênio total em pescado de água doce. — Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 81-86, 1999.

**RESUMO:** Foi determinado o teor de arsênio total em polpas e filés das seguintes espécies de peixes de água doce: Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Matrinxã (*Brycon lundii*), Carpa (*Cyprinus carpio*), Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Curimbatá (*Prochilodus sp.*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Bagre Africano (*Clarias sp.*), procedentes do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura, Pirassununga — São Paulo. A determinação do elemento arsênio foi realizada por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma de argônio induzido (ICP-AES) acoplado a um gerador de hidretos, nas amostras previamente mineralizadas por via seca com nitrato de magnésio. Os teores obtidos de arsênio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para os filés e polpas foram, respectivamente: Pacu (49 e 8), Matrinxã (27 e 24), Carpa (66 e 209), Tilápia (37 e 277), Curimbatá (30 e 93), Tambaqui (42 e 24) e Bagre (43). Em todas as amostras foram encontrados níveis de arsênio inferiores ao recomendado pela legislação brasileira.

**DESCRITORES:** arsênio, ICP-AES, gerador de hidretos, peixes.

### INTRODUÇÃO

O arsênio encontra-se amplamente distribuído na natureza, sendo uma espécie de constante interesse analítico. A contaminação dos alimentos por arsênio pode ter origem natural, podendo ser liberado no ambiente, a partir de minérios, por ação do intemperismo, erosões e vulcanismo<sup>8,14</sup>. Também pode ter origem antropogênica, devido à sua utilização na indústria (revestimento de madeiras, secantes de algodão, etc.) e na agricultura (herbicidas, fungicidas, pesticidas)<sup>8</sup>.

O arsênio é um elemento químico altamente tóxico ao organismo humano, sendo um conhecido agente car-

cinogênico<sup>17</sup>. Os peixes constituem uma das maiores fontes de arsênio na dieta humana<sup>3</sup>. No seu ciclo através do ecossistema aquático, o arsênio se acumula especialmente nos peixes, nos quais encontram-se concentrações mais elevadas do que em organismos terrestres<sup>10, 19</sup>.

A toxicidade do arsênio depende da forma química na qual é ingerido. As espécies inorgânicas de arsênio (III) são mais tóxicas que espécies de arsênio (V), seguidas pelas formas orgânicas (arsenocolina e arsenobetaina) que são as menos tóxicas. O arsênio inorgânico é reconhecido como uma forma tóxica cumulativa com sérios efeitos inclusive carcinogênico e facilmente

1 Departamento de Química Analítica — Instituto de Química — Unicamp — C. P.I 6154 — Campinas — SP — Brasil — Fone: (019) 788-3010 Fax: (019) 788-3023 — e-mail: lmelo@iqm.unicamp.br

2 Instituto de Tecnologia de Alimentos -Centro de Química e Nutrição Aplicada

Av. Brasil, 2880 -CEP 13073-001 — Campinas — SP — Brasil

Fone: (019) 2415222 / Fax: (019) 2424585 — e-mail: morgano@ital.org.br -e-mail: dilzambm@ital.org.br

absorvido pelo organismo. Doses de arsênio entre 30 e 100 miligramas podem ser fatais<sup>16</sup>.

A utilização da polpa de pescado, como matéria-prima para produtos formulados, permite uma recuperação maior das partes comestíveis do pescado comparativamente à obtida por métodos convencionais de filetagem. Uma grande variedade de produtos tem sido preparada a partir da polpa, incluindo salsichas, pastas, croquetes, isolados protéicos e bolinhos salgados. Produtos alimentícios desidratados também podem ser estimulados pela utilização de polpa de pescado. Todavia, a polpa de pescado obtida através da técnica de separação mecânica apresenta alguns problemas, tais como a presença de sangue, pigmentos, partículas ósseas, e fragmentos de pele e membranas que aceleram a deterioração dos produtos mesmo quando estocados a baixa temperatura<sup>15</sup>. Nenhum estudo para avaliar a contaminação por metais tóxicos, como arsênio, tem sido relatado na literatura para esta situação.

A determinação de elementos como arsênio, estanho, selênio, antimônio e mercúrio é mais eficiente quando se utiliza a técnica de geração de hidretos gasosos instáveis a altas temperaturas. Esta técnica resulta em determinações com alta seletividade e sensibilidade, com baixos limites de detecção devido a possibilidade de remover o analito da matriz e com baixa interferência espectral. A eficiência da etapa de geração de hidreto depende das condições experimentais e particularmente do estado de oxidação do analito. Algumas espécies se encontram em estado de oxidação não suscetíveis à formação de hidretos (como As(V) e Sb(V)) e devem ser convertidas a estados de oxidação adequados. O procedimento para geração do hidreto de arsênio, a arsina (AsH<sub>3</sub>), consiste na conversão de todo o arsênio presente na amostra em arsênio trivalente. O arsênio(V) é reduzido a arsênio(III) através da adição de solução aquosa de um redutor, o iodeto de potássio (solução a 45% (m/v)). Em seguida, obtém-se a arsina (AsH<sub>3</sub>), através da reação com borohidreto de sódio em meio ácido. A arsina é um composto extremamente volátil que deixa o meio reacional juntamente com a corrente de hidrogênio gerada; ao atingir o plasma ocorre a atomização<sup>2,6</sup>. Outro aspecto interessante desta técnica é de que ela pode ser implementada em sistema de injeção em fluxo (FIA).

Muitos trabalhos recentes<sup>3, 6, 20</sup>, tratam de espécies de água salgada. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de arsênio em pescado de água doce “*in natura*” através da técnica de geração de hidretos e quantificação em espectrômetro de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-AES). Os pescados avaliados correspondem às espécies de grande consumo pela população brasileira. Também foram avaliados os níveis de arsênio na polpa e filé das espécies estudadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

As amostras de pescado “*in natura*” usadas para a determinação do teor de arsênio foram procedentes do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura — CEPTA, IBAMA de Pirassununga (SP). Os peixes foram criados em tanques com idade entre 1 e 2 anos e alimentados com rações cuja composição básica é de: 26% de proteína bruta, 4,7% de lipídios, 6,5% de fibra bruta e 2600 kcal/kg de energia digestível estimada.

Para o estudo foram utilizados entre 50 a 100 kg de peixe de cada espécie. Para a determinação do teor de arsênio foi utilizada uma amostra composta (10 kg) representativa da quantidade total dos peixes. Os peixes inteiros foram filetados manualmente e a polpa foi obtida por separação mecânica do restante da carcaça dos peixes em máquina separadora de carne e ossos, marca Bibun, modelo SDX-13, na planta piloto de pescado do Centro de Tecnologia de Carnes, no Guarujá. A polpa refere-se à carne de pescado separada mecanicamente, obtida a partir do produto eviscerado e descabeçado submetido à ação da máquina de desossa mecânica e lavagem com água clorada. A separação mecânica basicamente envolve ações de dilaceração e compressão para remover a polpa do pescado. O rendimento do processo é de aproximadamente 60%.

Foram usadas as polpas e os filés das seguintes espécies: Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Matrinxã (*Brycon lundii*), Carpa (*Cyprinus carpio*), Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Curimatá (*Prochilodus sp.*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*); da espécie Bagre Africano (*Clarias sp.*) somente o filé foi avaliado.

### Preparação das Amostras

Após a desossa dos pescados “*in natura*”, as amostras das polpas e filés foram pré-trituradas em um processador de alimentos de uso doméstico e secas em estufa a 100°C durante 15 horas. Em seguida foram homogeneizadas integralmente em moinho Waring-Blender com copo de aço inoxidável até obter-se um pó fino do produto.

### Método

Para a determinação do teor de arsênio total das amostras, utilizou-se a técnica de mineralização por via seca com nitrato de magnésio de acordo com LEBLAND et alii<sup>10</sup>, conforme descrito a seguir: pesaram-se 2,0000g de amostra seca e pulverizada em um béquer de 150 mL, adicionaram-se 8 mL de solução aquosa de nitrato de magnésio a 50% (m/v) e 10 mL de ácido nítrico concen-

trado p.a. Aqueceu-se em chapa elétrica, evaporando-se o líquido até carbonização das amostras. Em seguida, o resíduo foi levado à mufla, com aquecimento gradual de temperatura até 450°C, permanecendo por 15 horas nesta temperatura. As cinzas, assim obtidas, foram dissolvidas com solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> em balão volumétrico de 25 mL e quinze minutos antes de proceder a quantificação do teor de arsênio das amostras, foram adicionados 500 µL de solução 50% (m/v) de iodeto de potássio.

A quantificação do arsênio foi realizada pela técnica de geração de hidretos usando-se um gerador de hidretos (PS Analytical, Kent, UK), sob fluxo contínuo, empregando-se solução 0,5% (m/v) de borohidreto de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> como agente redutor e solução 1 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico como carregador.

Como detector foi usado o espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente, modelo ICP 2000 simultâneo (BAIRD, Bedford, USA). As condições de operação do espectrômetro foram: potência de radiofrequência aplicada, 1200W; linha de emissão para o elemento As, 189,04 nm; pressão de gás na linha, 50 psi; ajuste de posição da tocha: horizontal, 19 mm e vertical 19,5 mm. Foi utilizada uma curva de calibração entre 0,001 a 0,100 mg kg<sup>-1</sup> para a quantificação do arsênio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação da Metodologia

O limite de detecção (LD) de arsênio foi determinado a partir da leitura da intensidade de emissão de 10 replicatas de branco, preparadas seguindo o mesmo procedimento de preparação de amostras. O limite de detecção foi calculado segundo LONG et alii<sup>11</sup>, a partir da equação:

$$LD = 3. \sigma_B / s \quad (1)$$

onde:  $\sigma_B$  é o desvio padrão relativo dos valores de intensidade de emissão e  $s$  é a sensibilidade do método (coeficiente angular da curva de calibração). O limite de detecção determinado foi de 6,5 µg kg<sup>-1</sup>.

Para a validação do método foi analisado o material de referência certificado, tecido de ostra SRM 1566a do National Institute of Standards & Technology (NIST). O resultado obtido para uma triplicata foi de 15,0 ± 1,1 µg kg<sup>-1</sup>, concordando com o valor certificado de 14,0 ± 1,2 µg kg<sup>-1</sup>.

Os elementos alumínio, ferro, cobre e zinco, presentes na amostra certificada de tecido de ostra SRM

1566a (NIST), são considerados os interferentes mais prováveis em amostras de peixes. Nenhuma interferência química foi observada no processo de geração de hidreto na presença de alumínio, ferro, cobre e zinco nas concentrações de 20 mg kg<sup>-1</sup>, 50 mg kg<sup>-1</sup>, 6 mg kg<sup>-1</sup> e 80 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, cujos níveis são maiores do que os encontrados nas amostra de peixes estudados. TRACY et alii<sup>21</sup> e HERSHEY & OOSTDYK<sup>9</sup> estudaram estes e outros interferentes metálicos em sistemas similares não verificando interferência destes metais na formação da arsina.

### Níveis de arsênio nas espécies de peixes estudados

O teor de arsênio foi avaliado tanto nos filés quanto nas polpas para verificar se o processo de desossa mecânica pode contribuir com aumento ou redução do teor deste elemento, pois as indústrias de produtos de processamento à base de pescado tem utilizado as polpas mecanicamente separadas com o objetivo de maior aproveitamento da matéria-prima.

Os teores de arsênio obtidos, na base úmida, em todas as espécies estudadas estão apresentados na Tabela 1. O teor de umidade das amostras variou de 69% a 78% para as polpas e de 66% a 79% para os filés. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos correspondem às médias dos valores obtidos com os respectivos desvios padrão ( $s$ ).

EGAAS & BRAEKKAN<sup>7</sup> determinaram o teor de arsênio em 43 amostras de peixes *in natura* e processados (enlatados) cujas concentrações variaram de 0,15 a 18,7 mg kg<sup>-1</sup>. LUNDE<sup>12</sup> analisou algumas espécies de peixes marinhos e encontrou teores de arsênio que variaram entre 1 e 20 mg kg<sup>-1</sup>. BROOK & EVANS<sup>5</sup> avaliaram o teor de arsênio inorgânico total em diferentes espécies marinhas e encontrou valores entre 1,1 a 26 mg kg<sup>-1</sup>. Os valores de arsênio encontrado neste estudo foram menores do que aqueles citados nas literaturas. Isto pode ser devido ao fato de tratar-se de peixes de água doce criados em cativeiro, enquanto os da literatura são espécies marinhas. Para as espécies analisadas não se encontrou literatura para comparação dos valores obtidos.

Através da tabela 1 foi verificado que, para as espécies de Pacu e Tambaqui os níveis de arsênio encontrados para os filés foram mais elevados do que para as polpas. Já para as espécies de Carpa, Tilápia e Curimatá ocorreu o inverso, ou seja, os maiores níveis de arsênio foram encontrados para a polpa. Para a espécie Matrinxã os níveis de arsênio estão próximos tanto na polpa quanto no filé. Os níveis de arsênio variaram de 27,27 a 66,03 µg kg<sup>-1</sup> para os filés e de 8,34 a 277 µg kg<sup>-1</sup> para as polpas.

Segundo SEARCY e HAMM<sup>18</sup> os teores de minerais podem diferir significativamente entre a carne meca-

Tabela 1. Níveis de arsênio total, na base úmida, das espécies de peixes estudadas.

Espécie	Concentração de arsênio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
	Polpa	Filé
Pacu	$8,34 \pm 1,62$	$49,19 \pm 1,00$
Matrinxã	$24,02 \pm 0,00$	$27,27 \pm 0,46$
Carpa	$209 \pm 1$	$66,03 \pm 1,06$
Tilápia	$277 \pm 1$	$37,62 \pm 2,46$
Curimbatá	$92,82 \pm 0,29$	$29,52 \pm 1,44$
Tambaqui	$23,67 \pm 2,13$	$42,49 \pm 1,67$
Bagre	—	$43,15 \pm 1,25$

nicamente separada e o filé porque pequenas quantidades de ossos e outros tecidos (sangue, tecido nervoso e conectivo) são incorporados à carne mecanicamente separada. Eles afirmam que a grande variação de elementos presentes em pequenas quantidades (como chumbo, cobre e manganês) nos produtos que usam carne mecanicamente separada podem ser explicadas pela contaminação durante a desossa, sugerindo que existe a necessidade de um controle frequente de lotes de produção.

Em muitos países, o teor de arsênio em alimentos é regulamentado por lei. No Brasil, o Decreto nº 55.871/65<sup>1</sup> (D.O.U. de 29/05/1965-Seção I/Parte I) traz na sua Tabela II a relação de aditivos incidentais toleráveis em alimentos<sup>13</sup>. A Portaria nº 685/98<sup>4</sup> da Secretaria de Vigilância Sanitária — MS (D.O.U. de 28/08/1998- Seção I) fixa valor máximo de arsênio para peixe e produtos de peixe em  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ . Sendo assim, observa-se que nenhuma das amostras analisadas está com o teor de arsênio além do nível máximo permitido.

## CONCLUSÕES

O método de preparo de amostra para a determinação de arsênio utilizando-se a técnica de mineralização por via seca com nitrato de magnésio e ácido nítrico mostrou-se eficiente e evitou a perda por volatilização do arsênio. A detecção de arsênio por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado ao gerador de hidretos apresentou boa reprodutibilidade dos dados e permite sua quantificação em níveis de traços em pescados.

A avaliação das espécies de peixes coletadas no CEPTA, IBAMA de Pirassununga, permite concluir que os níveis de arsênio estão de acordo com os estabelecidos pela legislação brasileira. Os níveis encontrados de arsênio nas polpas e filés diferiram entre as espécies estudadas. Nas espécies de Carpa, Tilápia e Curimbatá os níveis de arsênio foram maiores na polpa, enquanto que para as espécies Pacu e Tambaqui os níveis de arsênio foram maiores no filé. Na espécie Matrinxã os níveis de arsênio encontrados estão próximos tanto no filé quanto na polpa.

MELO, L.F.C.; MORGANO, M. A. & MANTOVANI, D.M.B. Evaluation of arsenic content in fish from freshwater. — Rev. Instituto Adolfo Lutz, 58(2): 1999.

ABSTRACTS: The level of arsenic was determined in pulps and steak of the following freshwater fish species: Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Matrinxã (*Brycon lundii*), Carp (*Cyprinus carpio*), Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Curimatá (*Prochilodus sp.*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Bagre Africano (*Clarias sp.*). The samples were obtained from the Center of Research and Training in Agriculture, Pirassununga, São Paulo. The determination of the arsenic element was performed by hydride generator-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), after mineralizing by drying with magnesium nitrate of the samples. The quantity obtained of arsenic in  $\mu\text{g kg}^{-1}$  from the fishes for steak and pulps respectively were: Pacu (49 e 8), Matrinxã (27 e 24), Carp (66 e 209), Tilápia (37 e 277), Curimatá (30 e 93), Tambaqui (42 e 24) e Bagre (43). Arsenic levels below the recommended Brazilian legislation were found in all samples.

KEY WORDS: arsenic; ICP-AES; hydride generator, fish.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. *Compêndio de normas e padrões para alimentos*, São Paulo, 1990.
2. BOWMAN, J.; FAIRMAN, B.; CATTERICK, T. Development of a multi-element hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry procedure for the simultaneous determination of arsenic, antimony and selenium in waters. *J. Anal. Atom. Spec.*, 12: 313-316, 1997.
3. BRANCH, S.; EBDON, L.; O'NEILL, P. Determination of Arsenic Species in Fish by Directly Coupled High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. Atom. Spec.*, 9: 33-37, 1994.
4. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria no 685 de 27/08/98. *Diário Oficial da União*, Brasília, 24/09/98. Seção 1, p. 1-4.
5. BROOKE, P.J.; EVANS, W.H. Determination of total inorganic arsenic in fish, shellfish and fish products. *Analyst*, 106: 514-520, 1981.
6. DAMKRÖGER, G.; GROTE, M.; JANßEN, S. Comparison of sample digestion procedures for the determination of arsenic in certified marine samples using the FI-HG-AAS-technique. *Fres. J. Anal. Chem.*, 357: 817-821, 1997.
7. EGAAS, E.; BRAEKKAN, O. R. The arsenic content in some Norwegian fish products. *Fish Dir. Skr. Ernaring*, 1(3): 93-98, 1977.
8. EL MOLL, A.; HEIMBURGER, R.; LAGARDE, F.; LEROY, M.J.F.; MAIER, E. Arsenic speciation in marine organisms: from the analytical methodology to the constitution of reference materials. *Fres. J. Anal. Chem.*, 354: 550-556, 1996.
9. HERSHEY, J.W.; OOSTDYK, T.S. Determination of arsenic and selenium in environmental and agricultural samples by hydride generation atomic absorption spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(6): 1090-1093, 1988.
10. LEBLAND, P.J.; JACKSON, A.L. Dry ashing technique for the determination of arsenic in marine fish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56(2): 383-386, 1973.
11. LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, 55(7): 712A-724A, 1983.
12. LUNDE, G. Analysis of arsenic and selenium in marine raw materials. *J. Sci. Food Agric.*, 21(5): 242-247, 1970.
13. MANTOVANI, D.M.B. Contaminantes metálicos em pescados. In: KAI, M.; RUIVO, U.E. *Seminário sobre controle de qualidade na indústria de pescado*, Santos, 1988. Santos Editora Universitária Leopoldinum, São Paulo, Edições Loyola, 1988, p. 231-238.
14. MANTOVANI, D.M.B.; ANGELUCCI, E. Avaliação do teor de arsênico em atum e sardinha. *Bol. SBCTA*, 26(1): 1-5, 1992.
15. MORAIS, C.; AGUIRRE, J.M.; DELAZARI, I.; PIZZINATO, A.; TRAVAGLINI, M.M.E.; FIGUEIREDO, I.B.; SALES, A.M.; KAI, M. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 18(2): 177-199, 1981.
16. REILLY, C. *Metal Contamination of Food* 2.ed. London: Elsevier, 1991.
17. SANTA MARIA, I.; GONZALEZ, M.; LARA, W.; OBER, A. Arsenic levels in Chilean marine species.

- Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology*, 37(4): 593-598, 1986.
18. SEARCY, G.K.; HAMM, D. Mineral contents of commercial samples of mechanically deboned poultry meat. *Poultry Sci.*, 60: 686-688, 1981.
  19. SHINAGAWA, A.; SHIOMI, K.; YAMANAKA, H.; HIKUCHI, T. Selective determination of inorganic arsenic (III), (V) and organic arsenic in marine organisms. *Bulletin of Japan Society of Scientific Fisheries*, 49(1): 75-78, 1983.
  20. TAKATSU, A.; UCHIUMI, A. Abnormal arsenic accumulation by fish living in a naturally acidified lake. *Analyst*, 123: 73-75, 1998.
  21. TRACY, M.L.; LITTLEFIELD, E.S.; MOLLER, G. Continuous flow vapor generation for inductively coupled plasma argon plasma spectrometric analysis. Part 2. Arsenic. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74(3): 516-521, 1991.

Recebido para publicação em 24/03/1999.

## AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉS VERDES E TORRADOS

Regina Prado Zanes FURLANI\*  
Lucia M. VALENTE SOARES\*  
Paulo Lauro C. de OLIVEIRA\*\*

RIALA 06/870

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. — Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 87-98, 1999.

**RESUMO:** Diferentes solventes de extração, assim como técnicas para limpeza de extratos para determinação de micotoxinas, tanto clássicas (clarificação, partição) como aquelas envolvendo colunas para extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil e imunoafinidade) foram avaliadas para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado. Apenas as colunas de imunoafinidade foram capazes de remover os interferentes existentes nos extratos de café permitindo a determinação de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência em níveis de 0,7 ng/g. Colunas de imunoafinidade de duas marcas diferentes foram testadas com relação à recuperação da toxina e à reutilização em outras análises. Colunas de uma marca apresentaram recuperação média de 97% no primeiro uso e acima de 70% até a quarta utilização. Colunas de uma segunda marca apresentaram recuperação média de 73% no primeiro uso e abaixo de 30% no segundo.

**DESCRITORES:** Ocratoxina A, café, micotoxinas.

### INTRODUÇÃO

A ocratoxina A é um metabólito tóxico produzido por determinadas cepas de *Penicillium* e *Aspergillus*. A principal espécie conhecida como produtora de ocratoxina é *A. ochraceus*<sup>15</sup>. A ocratoxina A é nefrotóxica e tem ação teratogênica. O fígado é um alvo secundário da toxina<sup>4,7</sup>. A nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins em humanos que muitas vezes leva à morte, tem sido correlacionada com os altos níveis de contaminação por ocratoxina A constatada nos alimentos daquela região<sup>20</sup>.

A ocratoxina A tem sido encontrada em cereais diversos<sup>21,24,26</sup>, alimentos de origem animal<sup>11,20,21</sup>, cerve-

ja<sup>20,21</sup>, vinho e suco de uva<sup>36</sup>, grãos de café verde e torrado<sup>14,27,30,31</sup> e em café solúvel<sup>17</sup>.

Os limites máximos permitidos para ocratoxina A já existentes ou em fase de proposta em diversos países, variam de 1 a 5 ng/g para alimentos infantis, 2 a 50 ng/g para cereais e 5 a 300 ng/g para rações<sup>33</sup>. Na União Européia existem sugestões de limites máximos de 5 ng/g para cereais e 1 ng/g para alimentos infantis<sup>34</sup>. A Itália, em 1996, propôs um limite de 4 ng/g para café verde em grãos<sup>6</sup>. No Brasil não existem limites para ocratoxina A em alimentos e, por outro lado, desconhece-se a situação do café produzido no país com relação a essa toxina. O café verde corresponde a 4,6% das exportações brasileiras, ocupando portanto um lugar de desta-

\* Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. CP 6121, 13081-970, Campinas. São Paulo.

\*\* Companhia Caciue de Café Solúvel, Rua Horácio Sabino Coimbra, 100, 86072-900, Londrina, Paraná.

que. O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de café. A bebida, por sua vez, é largamente consumida no país e em 1997 absorveu internamente 11,4 milhões de sacas da produção total de 18,9 milhões de sacas produzidos no país<sup>13</sup>. No entanto, qualquer trabalho de investigação da incidência desta toxina em café nacional passa necessariamente por uma avaliação da metodologia analítica disponível e sua aplicabilidade às condições existentes nos laboratórios nacionais.

Vários procedimentos para determinação de ocratoxina A em café têm sido propostos. A metodologia da *AOAC International*<sup>2</sup> utiliza cromatografia em camada delgada para determinar ocratoxina A em café verde. O limite de detecção desse método é de 20 ng/g de ocratoxina A. Com os limites que estão atualmente sendo propostos para café, este tipo de metodologia torna-se ineficaz. Por outro lado, o café é uma matriz especialmente complexa e uma limpeza adequada do extrato para remoção de interferentes faz-se necessário para que limites mais baixos sejam alcançados.

CANTÀFORA *et al*<sup>5</sup> introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para separar e detectar a ocratoxina A em café verde e alcançaram um limite de detecção 100 vezes menor que o do método da *AOAC*<sup>2</sup>. TERADA *et al*<sup>29</sup>, também utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência, aplicaram colunas de extração em fase sólida de octadecilsilil para limpeza de extratos de grãos de café (verde e torrado), café instantâneo e café coado. O limite de detecção alcançado estava entre 0,2 e 5 ng/g e a recuperação citada foi de 80,7% ou melhor.

NAKAJIMA *et al*<sup>16</sup> desenvolveram uma metodologia que utilizava colunas de imunoafinidade para a limpeza do extrato de amostras de café em grãos, café instantâneo em pó e bebida de café enlatada. Estes autores relataram limites de detecção de 0,5 ng/g para cafés em grão e cafés solúveis e recuperações acima de 98%. PIT-TET *et al*<sup>19</sup> propuseram um procedimento para analisar a ocratoxina A em amostras de café verde em grãos, café torrado em grãos e café solúvel que também envolve limpeza em colunas de imunoafinidade. Os cromatogramas, apresentados pelos autores, mostraram-se sem interferentes na região da ocratoxina A. O limite de detecção descrito foi de 0,2 ng/g e a recuperação de 80% ou mais.

Com base nestas considerações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicabilidade para café das técnicas analíticas existentes para determinação de ocratoxina A e, através desta avaliação, escolher uma metodologia dotada dos necessários requisitos de sensibilidade, precisão e exatidão para que possa ser usada em laboratórios nacionais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes, solventes e materiais diversos: padrão de ocratoxina A, marca Sigma; filtros para amostra, marca Millipore, poro de 0,45µm, 13mm de diâmetro; filtro de microfibras de vidro GF/B, marca Whatman; tampão fosfato (PBS), marca Sigma; placas para cromatografia em camada delgada de sílica gel, marca Merck; reagentes de uso comum em laboratório, grau analítico; solventes para cromatografia, grau cromatográfico; colunas de extração em fase sólida com fase estacionária de sílica, octadecilsilil, cianopropil e de imunoafinidade específicas para ocratoxina A.

Equipamentos: espectrofotômetro ultravioleta / visível, modelo Lambda 6, marca Perkin Elmer; pré coluna Varian, com fase estacionária de sílica; cromatógrafo líquido de alta eficiência: bomba marca Waters, modelo 510; injetor Rheodine com alça de 20 L ou de 100L; detector de fluorescência programável, marca HP, modelo 1046A e integrador marca HP, modelo 3393A; coluna de guarda Varian, com fase estacionária de Octadecilsilil; coluna analítica Spherisorb ODS-2, 5µm, Sigma Aldrich, 250mm X 4,6mm; liqüidificador comum de uso doméstico, marca Arno; lâmpada ultravioleta de alta intensidade, modelo UVGL58, multibanda 254/366nm, marca Mineral Light; banho ultra-som, modelo SX-20, marca Microsonic; ultrapurificador de água, marca "MilliQ"; dispositivo para filtração à vácuo para colunas de extração em fase sólida, modelo "Visiprep DL", marca Supelco.

Preparo do padrão de ocratoxina A: foi preparada uma solução estoque do padrão de ocratoxina A com 100 g/mL em benzeno. Foi verificada a pureza dessa solução em camada delgada, nas condições descritas no item seguinte e visualizando-se o padrão sob luz ultravioleta. Considerou-se a presença de uma única mancha como indicativo do padrão não estar contaminado ou decomposto. A partir da solução estoque, foi preparada uma solução intermediária de aproximadamente 20 µg/mL em ácido acético/ benzeno (1+99) e a sua concentração exata foi determinada espectrofotometricamente segundo o procedimento da *AOAC*<sup>2</sup>. A partir desta solução intermediária foi realizada uma nova diluição (1:20) em metanol / ácido acético 9% (65+35) sempre que necessário e esta solução foi empregada para a quantificação da ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência. Antes de empregar o padrão, este foi agitado no ultra-som por 30 segundos.

Cromatografia em camada delgada: a fase estacionária utilizada foi sílica gel e a fase móvel foi tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1). Os extratos secos foram dissolvidos em 200 µL de benzeno, agitados em ultra-som por 30 minutos e aplicados na camada. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta de comprimentos de onda de 254 nm.

mento de onda 366nm. A quantificação da ocratoxina A foi conseguida por comparação visual com padrão.

Cromatografia líquida de alta eficiência: As condições utilizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência foram as descritas por STUDER-ROHR *et al*<sup>28</sup>. A fase móvel foi metanol/ácido acético 9% (65+35) e a vazão de 1,0 mL/min. Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação = 330 nm e emissão = 470 nm. A quantificação da ocratoxina A foi realizada por padronização externa a partir de injeções realizadas com o padrão. A faixa de concentração foi de 0,2 a 2,5 ng para um volume de injeção de 100 µL e 2 ng para 20 µL. Todos os extratos secos foram redissolvidos em 1 mL da fase móvel e filtrado através de filtro 0,45 µm. Foi testada a repetibilidade do detetor injetando-se 5 vezes o padrão de 1 µg/mL em um volume de injeção de 20 µL do injetor, nas condições cromatográficas descritas acima.

Testes de recuperação do padrão de ocratoxina A adicionado em colunas de extração em fase sólida: para avaliar a recuperação da toxina nas colunas de extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil, cianopropil e imunoafinidade) foram testados vários procedimentos descritos na literatura para condicionamento, transferência, lavagem e eluição da toxina, utilizando-se o padrão de ocratoxina A. Cem ng de ocratoxina A foram transferidos para a coluna com ajuda do eluente da primeira fração. Todas as frações foram recolhidas separadamente e evaporadas até a secura e redissolvidas em 200 µL de benzeno quando utilizando cromatografia em camada delgada ou em 1mL de metanol/ácido acético 9% (65+35) quando utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Os sistemas de solventes empregados estão descritos nas Tabelas 1 a 6.

Tabela 1. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil.

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL metanol e 10 mL água	10 mL metanol com 0,1% ácido acético	10 mL metanol com 0,1% ácido acético	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (60+40+0,5)		
10 mL metanol e 10 mL água	10 mL metanol	10 mL metanol	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (60+40+0,5)		
10 mL metanol e 10 mL água	4 mL água	15 mL 40% acetona em água	5 mL água	15 mL 40% acetonitrila em água	
20 mL metanol e 20 mL água e 2mL CTA 0,005M	10 mL água	15 mL 40% cetona em água	5 mL água	15 mL 40% acetonitrila em água	
8,5 mL metanol, 8,5 mL água e 2mL Brometo de cetiltrimetilamoníum 0,005M	10 mL tampão fosfato pH=5,6 em 2,5mM CTA	15 mL 40% acetona em água	5 mL água	15 mL 40% acetonitrila em água	TERADA <i>et al</i> <sup>29</sup>

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia em camada delgada. CTA — Brometo de cetilmetilamoníum.

Tabela 2. Sistemas testados para eluição de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL água	20 mL água	20 mL metanol com 0,1% ácido acético			JW Scientific Products <sup>12</sup>
—	5 mL metanol e 5 mL água	6 mL água	3 mL em gradiente 10% metanol até 100% metanol	3mL acetona	
5 mL hexano, 5mL acetato etila e 5 mL metanol	5 mL metanol	5 mL clorofórmio			

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 3. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo cianopropil.

Condicionamento da coluna	Aplicação da Toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3
10 mL tolueno	30 mL Tolueno	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)	20 mL metanol com 0,1% ácido acético
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	10 mL metanol / clorofórmio (1+19)	20 mL tolueno/ acetato de etila / ácido acético (50+49+1)

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica.

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL clorofórmio	4 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	15 mL clorofórmio/ácido fórmico (100+2)		VALENTA & GOLL <sup>32</sup> , BREITHOLTZ <i>et alii</i> <sup>3</sup> .
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	20 mL clorofórmio / acetona (9+1)	20 mL clorofórmio / ácido fórmico (100+2)	
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	15 mL clorofórmio/ácido fórmico (100+2)	10 mL clorofórmio/acetona (9+1)		
10 mL hexano	10 mL hexano	10 mL hexano / clorofórmio (9+1)	10 mL metanol / clorofórmio (3+97)	10 mL tolueno / ácido acético (9+1)	HÄGGBLOM & GHOSH <sup>8</sup> .
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio/acetona (9+1)	10 mL metanol / clorofórmio (3+97)	10 mL tolueno / ácido fórmico (100+2)	

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em camada delgada.

Limpeza dos extratos: três enfoques foram testados, tanto em separado quanto combinados para o café verde e para o café torrado: clarificação, partição e extração em fase sólida com fases estacionárias diversas (de sílica, de octadecilsilil e de imunoafinidade).

Clarificação: foram testados individualmente os seguintes clarificantes para amostras de café verde e torrado, todos já de uso tradicional em determinações de micotoxinas: sulfato de amônio (30%), acetato de chumbo (20%), sulfato de cobre (10%), mistura de ferrocianeto de potássio (0,25M) e acetato de zinco (1M) e mistura de acetato de chumbo (20%) e sulfato de amônio (30%). Após a clarificação procedeu-se a uma etapa de partição para clorofórmio. O procedimento empregado está apresentado na Figura 1. Os extratos obtidos foram aplicados em cromatografia de camada delgada (café torrado) e em cromatografia líquida de alta eficiência

(café verde e torrado) conforme descrito em Material e Métodos.

Também foi testado, em amostras de café verde e torrado utilizando-se os clarificantes citados acima, o método proposto por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA<sup>22</sup>. O procedimento aplicado está apresentado na Figura 2. Os extratos obtidos a partir desse procedimento foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Partição: foi testado um desengorduramento com ciclohexano antes da partição para clorofórmio.

Extração em fase sólida:

— Sílica e Octadecilsilil: foi testada a limpeza de extratos em colunas para extração em fase sólida com fases estacionárias de sílica e de octadecilsilil. As colunas foram avaliadas com extratos de café verde e torrado fortificados artificialmente com ocratoxina A ao nível de 10 ng/g. (Tabelas 7 e 8). As amostras artificialmente

Tabela 5. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica.

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL tolueno / acetato de etila (6+4)	20 mL tolueno / acetato de etila (6+4)	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1)	10mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+47+3)		
10 mL clorofórmio	10mL clorofórmico	20 mL clorofórmio / metanol (19+1)	20 mL clorofórmio / ácido fórmico (19+1)	20 mL metanol com 0,1% ácido acético	
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	20 mL / metanol clorofórmio / metanol (19+1)	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)		
10 mL tolueno / acetato de etila (8+2)	10 mL tolueno / acetato de etila (8+2)	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1)	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1)	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1)	
—	30 mL tolueno	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)			
7 mL metanol e 7 mL clorofórmio	7 mL clorofórmio	5 mL metanol			
7 mL metanol e 7 mL clorofórmio	2+5 mL clorofórmio	5 mL metanol	5 mL acetona		
10 mL diclorometano	10 mL diclorometano	10 mL diclorometano / ácido fórmico (98+2)			SCOTT <i>et al.</i> <sup>23</sup>

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 6. Sistemas testados para eluição de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo imunoafinidade

Transferência da Ocratoxina A	Fração 1	Fração 2	Fração 3
10 mL bicarbonato de sódio 1% / tampão fosfato, pH7,4 (1+1)	20 mL água	1,5 mL metanol / ácido acético (98:2) e 1,5 mL água	Rhône-Diagnostics <sup>22</sup>

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

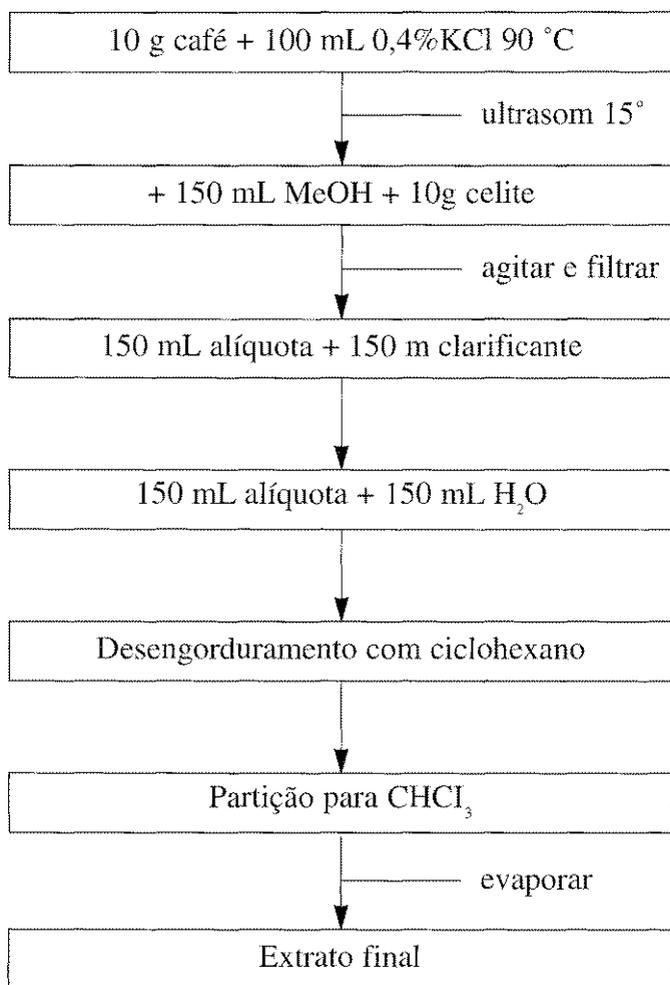


Figura 1 - Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%), acetato de chumbo (20%), sulfato de cobre (10%), mistura de ferrocianeto de potássio (0,25M) e acetato de zinco (1M) e mistura de acetato de chumbo (20%) e sulfato de amônio (30%).

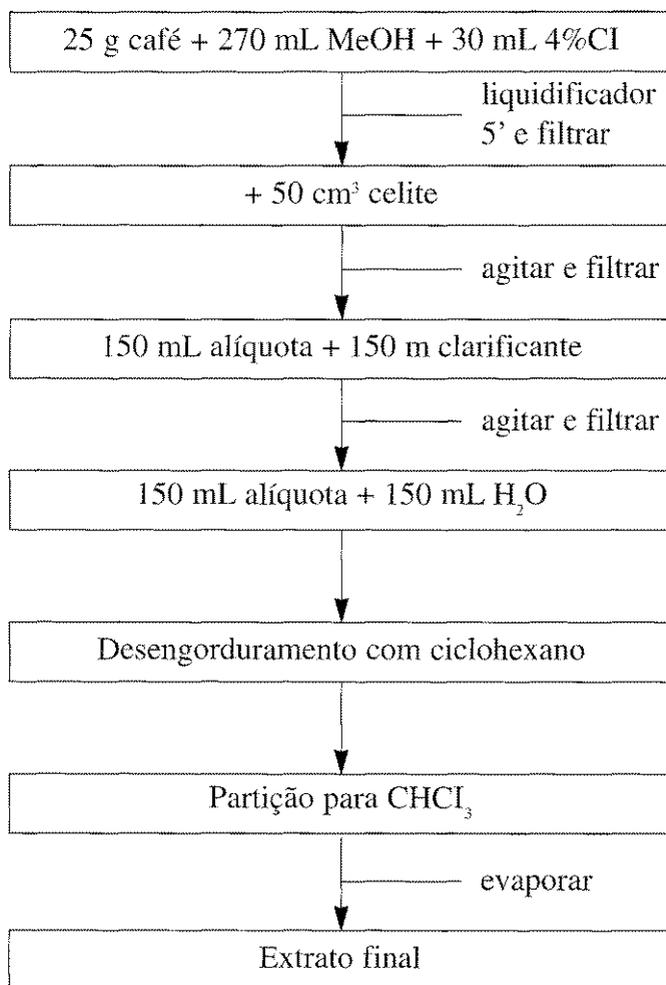


Figura 2 - Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%) e sulfato de cobre (10%).

Tabela 7. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica.

Condiciona- mento da coluna	Transferência da toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Fração 5	Referência
5 mL tolueno	5 mL tolueno	5 mL tolueno/ acetona (95+5)	5 mL dietileter/ hexano (75+25)	5 mL clorofórmio / / metanol 97+3)	5 mL tolueno/ ácido acético (9+1)	Patel <i>et alii</i> <sup>18</sup> ; Howel&Taylor <sup>9</sup>

Testes realizados com extratos de café torrado contaminados artificialmente com padrão de ocratoxina A (10 ng/g). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 8. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil.

Condicionamento da coluna	Transferência da Toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3
10 mL água	10 mL água	20 mL água	Transferir a ocratoxina A da fase aquosa para clorofórmio
5 mL hexano, 5 mL acetato etila e 5 mL metanol	7 mL metanol	5 mL clorofórmio	

Testes realizados com extratos de café torrado contaminados artificialmente com padrão de ocratoxina A (10 ng/g). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

contaminadas foram extraídas conforme o procedimento apresentado na Figura 1, utilizando-se sulfato de cobre como clarificante.

— Imunoafinidade: foram também avaliadas colunas de imunoafinidade de duas marcas comerciais. Os testes foram realizados com amostras de café verde e torrado contaminadas com padrão de ocratoxina A ao nível de 10 ng/g. A metodologia utilizada foi a recomendada pelo fabricante de uma das marcas das colunas e apresentada na Figura 3. A metodologia preconizada pelo outro fabricante de colunas de imunoafinidade foi considerada não apropriada por desativar a coluna desnaturando-a, impedindo a reutilização. O extrato obtido foi injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência, com volume de injeção de 100 µL, conforme descrito em Material e Métodos.

Testes de reutilização das colunas de imunoafinidade: a reutilização de duas marcas de colunas de imunoafinidade foi verificada. O teste foi realizado em triplicata para a marca B e quadruplicata para a marca A. A metodologia aplicada está apresentada na Figura 3. Após a eluição da ocratoxina A, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão PBS, pH 7,4 contendo azida de sódio (0,5g/L) e colocada sob refrigeração (3-8°C) em geladeira comum por no mínimo 48 horas<sup>35</sup>. Foi utilizada uma amostra não contaminada de café verde, à qual foi adicionado padrão de ocratoxina A dissolvido em metanol/ácido acético até obter 10 ng/g. Cem µL do extrato obtido foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência conforme descrito em Material e Métodos.

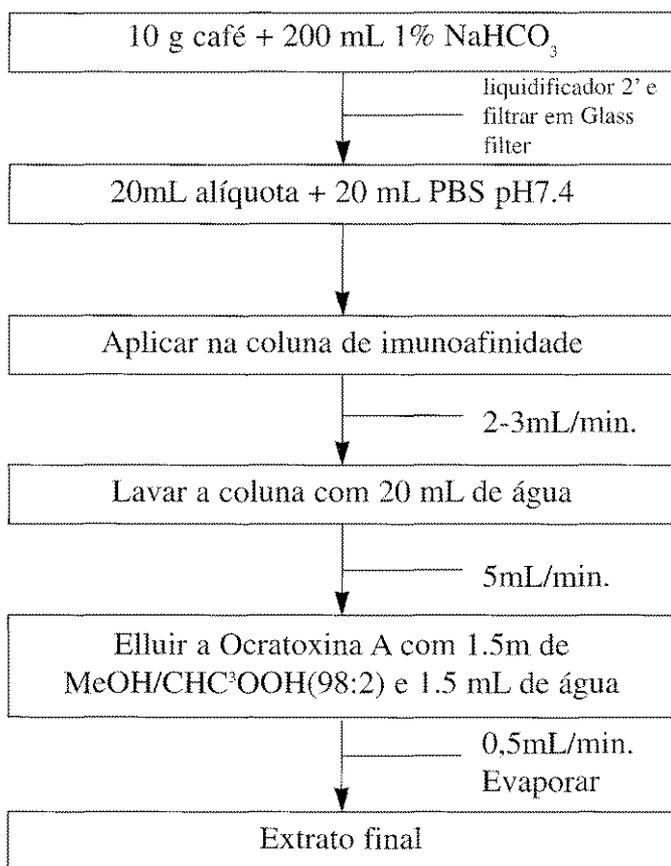


Figura 3. Procedimento empregado para a verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado em colunas de imunoafinidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sensibilidade e repetibilidade do detector: a área média obtida de 5 injeções do padrão de ocratoxina A (1 µg/mL) foi de  $214201 \pm 3794$  e o coeficiente de variação de 1,8%. A sensibilidade foi calculada como preconizado pela IUPAC<sup>10</sup>. A sensibilidade obtida foi  $24869 \times 10^7$  mV. cm<sup>3</sup>. mg<sup>-1</sup>.

Recuperação do padrão de ocratoxina A adicionado em colunas de extração em fase sólida: para os sistemas de solventes testados em colunas de fase sólida de octadecilsilil e cromatografia em camada delgada (Tabela 1), a recuperação da ocratoxina A foi inferior a 30% e geralmente a eluição do padrão ocorreu em mais de uma fração. No sistema que utiliza água para condicionar a coluna, apresentado na Tabela 2, foi obtida uma recuperação de 95% da toxina na fração I (água). Quando a coluna foi condicionada com hexano, acetato de etila e metanol a recuperação foi de 84% na fração I (metanol).

Os resultados dos testes de recuperação em colunas de cianopropil com os sistemas de solventes apresentados na Tabela 3 foram ineficientes, não ocorrendo recuperação da toxina em nenhuma fração.

Os sistemas de solventes para eluição da ocratoxina A em colunas de sílica (Tabela 4), com detecção em cromatografia em camada delgada, também foram ineficientes. As recuperações obtidas ficaram entre 30 e 40% e a toxina eluiu em mais de uma fração.

A maior recuperação obtida na eluição da ocratoxina A em colunas de sílica com detecção em cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela 5), foi de 56% no sistema que utilizou clorofórmio para condicionar, clorofórmio e metanol para lavar e tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1) para eluir a toxina. O sistema que utilizou tolueno/acetato de etila (6+4) para condicionar e tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (50+49+1) para lavar a coluna, obteve uma recuperação de 53% na fração I. Nos demais sistemas a recuperação foi abaixo de 30% ou nenhuma.

Para colunas de imunoafinidade, o procedimento preconizado pelo fabricante das colunas A, mostrou-se adequado para a recuperação do padrão de ocratoxina A. O valor médio de recuperação foi de  $87,5 \pm 14,8\%$  e o desvio padrão relativo médio foi de 10%.

Limpeza dos extratos de café verde e torrado:

— Clarificação: Os extratos de café torrado, após clarificação, apresentaram cor marrom escuro. Após a partição para clorofórmio, uma emulsão foi formada e quebrada com banho em ultra-som e as fases clorofórmicas apresentaram-se turvas e de cor marrom. A camada delgada, após revelação sob luz ultravioleta, mostrou grande quantidade de co-extrativos sobre toda a região de desenvolvimento inclusive sobre a região da ocratoxina A. O clarificante sulfato de cobre apresentou-se ligeiramente mais eficaz que os demais, mas ainda sem propiciar uma visualização adequada. Os mesmos extratos, quando injetados em cromatografia líquida de alta eficiência, apresentaram cromatogramas em que havia co-extrativos fluorescentes, o que ocasionou a elevação da linha de base até o final da escala. Quando utilizamos a mesma metodologia para café verde e submetemos os extratos em cromatografia líquida de alta eficiência, houve um grande número de interferentes com o mesmo tempo de retenção da ocratoxina A, não sendo possível quantificá-la.

— Partição: O desgorduramento com ciclohexano, antes da partição para clorofórmio, não apresentou mudanças significativas na limpeza dos extratos, tanto para café verde, quanto para café torrado.

— Limpeza em fase sólida: Os extratos de café verde e torrado obtidos da extração que foram aplicados em colunas de sílica e octadecilsilil (Tabelas 7 e 8) e sub-

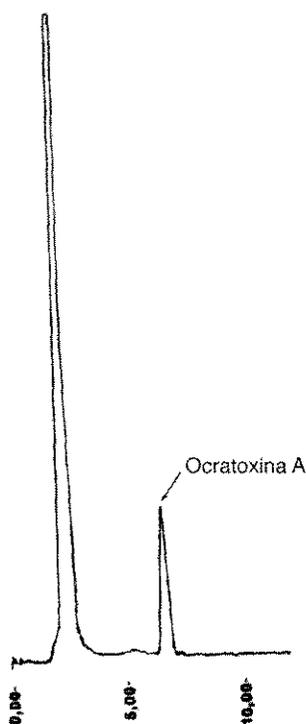


Figura 4. Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminado artificialmente com ocratoxina A.

metidos a cromatografia líquida de alta eficiência apresentaram limpeza ineficiente, com muitos interferentes aparecendo no mesmo tempo de retenção da ocratoxina A.

Os extratos de café, tanto verde como o torrado, obtidos após limpeza em colunas de imunoafinidade, apresentaram cromatogramas limpos (Figura 4), sem interferentes no tempo de retenção da ocratoxina A, garantindo uma quantificação adequada. O valor médio de recuperação para 4 determinações de ocratoxina A em amostras de café verde artificialmente contaminados ao

nível de 10 ng/g foi de 97,3 ± 2,5% com coeficiente de variação de 2,6%. Testes com café torrado mostraram recuperações da mesma ordem de grandeza que com café verde. Testes com café torrado mostraram recuperações da mesma ordem de grandeza que com café verde.

Reutilização das colunas de imunoafinidade com extratos de café verde: A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para a recuperação da ocratoxina A adicionada a café verde em colunas de imunoafinidade de duas marcas comerciais quando reutilizadas sucessivamente. A marca A apresentou recuperações aceitáveis quando utilizada até por 4 vezes. A marca B apresentou recuperação mais baixa (73%) que a marca A (97%) já na primeira utilização, e recuperação muito baixa na segunda utilização, não podendo ser empregada mais de uma vez.

Embora o valor de compra das colunas de imunoafinidade seja alto, o estudo de reutilização das mesmas demonstrou que as colunas de uma das marcas testadas podem ser empregadas diversas vezes, o que reduziria o custo das análises. Uma outra vantagem, que não deve ser desprezada, está na pequena quantidade de solventes orgânicos utilizados no procedimento, não expondo assim o analista a vapores tóxicos.

O limite de detecção em amostras de cafés verdes e torrados, após limpeza em coluna de imunoafinidade quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência, foi determinado como preconizado pela ACS<sup>1</sup>. Nas condições empregadas e já descritas para cromatografia líquida, o limite de detecção foi de 0,7 ng/g. Este limite de detecção está na mesma ordem de grandeza do relatado por autores que usam colunas de imunoafinidade para limpeza dos extratos e cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência para quantificação da toxina<sup>16,17,19,28,29</sup>. Pequenas variações nos limites de detecção relatados nos diversos trabalhos podem ser atribuídos à diferentes níveis de sensibilidade dos detetores de fluorescência utilizados por cada laboratório.

Tabela 9. Teste de reutilização de colunas de imunoafinidade específicas para ocratoxina A de marcas diferentes.

Coluna	Recuperação (%) ± desvio padrão			
	1ª utilização	2ª utilização	3ª utilização	4ª utilização
Marca A	97,3±2,5	86,3±12,3	73,8±19,9	74,3±32,3
Marca B	73±1,7	29,6±4,7	—	—

Recuperação em amostras de café verde artificialmente contaminadas com ocratoxina A ao nível de 10 ng/g. Resultados indicam média e desvio padrão de 4 repetições por experimento no caso da marca A e 3 repetições por experimento no caso da marca B.

## CONCLUSÕES

As técnicas de bancada que utilizam clarificantes e partição para a limpeza em amostras de alimentos não produziram resultados satisfatórios com relação a amostras de café verde ou torrado. Da mesma maneira, as colunas de extração em fase sólida de sílica, cianopropil e octadecilsilil não apresentaram limpeza ou recuperação

adequadas para as amostras estudadas. Já as colunas de imunoafinidade mostraram-se eficientes quanto à limpeza e à recuperação, tanto quando só o padrão foi adicionado como com amostras artificialmente contaminadas. A diferença exibida pelas colunas de marcas diferentes na recuperação da ocratoxina A (97% e 73%) já durante o primeiro uso, indicam a necessidade de testar as colunas durante sua utilização

RIALA 06/870

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. — Evaluation of methods for ochratoxin A determination in green and roasted coffees. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2) 87-98, 1999.

**ABSTRACT:** Different extraction solvents and cleanup techniques for mycotoxins determination were evaluated for green and roasted coffee. Classical techniques such as partition and clarification as well as solid phase extraction (silica, octadecylsilyl), cyanopropyl and immunoaffinity columns) were tested. Only immunoaffinity columns were capable to effectively remove interferences from coffee extracts allowing ochratoxin A to be determined by HPLC and fluorescence detection at levels of 0,7 ng/g. Two commercial brands of immunoaffinity columns were evaluated for ochratoxin A recovery and repeated use. Average recovery for one brand was 97% and was above 70% on the fourth use. Average recovery for a second brand was 73% on the first use and below 30% on the second use.

**KEY WORDS:** Ochratoxin A, coffee, mycotoxins.

## REFERÊNCIAS

1. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 52: 2242 — 2249, 1980.
2. AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev., Gaithersburg, MD, Method 975.38, 1997.
3. BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I. & HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples, *J. AOAC Int.*, 76: 842-846, 1993.
4. BUSBY JR., W.F. & WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: *Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks*, Boca Raton, SHANK, R.C., 1981, vol.II, p.129-136.
5. CANTAFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M. & BENELLI, L., Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography, *Riv. Soc. Ital. Alimen.*, 12: 103-108, 1983.
6. DIPARTIMENTO DOGANE — *Circolare n.76* — Ministero delle Finanze — Roma, Itália, 21/03/1996.
7. DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Add. Contam.*, 13: 45-48, Supplement, 1996.
8. HÄGGBLUM, P.E. & GHOSH, J. Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 787-790, 1985.
9. HOWELL, M.V. & TAYLOR, P.W. Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 1356-1363, 1981.
10. INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl. Chem.* 65: 819-872, 1993.
11. JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A, *Food Add. Contam.* 15: 550-554, 1998.
12. JW Scientific Products Catalog & Reference Guide, 1992-93.
13. MORICOCHI, L. Café. [[http://www.iea.sp.gov.br/café\\_98.htm](http://www.iea.sp.gov.br/café_98.htm)], 29/06/99.
14. MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M. & BRERA, C. Study of the contamination by ochrato-

- xin A of green and roasted coffee beans. *Food Add. Contam.*, 6: 333-339, 1989.
15. MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Add. Contam.*, 13: 5-9, Supplement, 1996.
  16. NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y. & UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. *Food Agric. Immunol.*, 2: 189-195, 1990.
  17. PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. & GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Add. Contam.*, 14: 217-222, 1997.
  18. PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. & MORTBY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Add. Contam.*, 13: 833-841, 1996.
  19. PITET, A.; TORNARE, D.; HUGGET, A. & VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using analyze immunoaffinity column cleanup procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3564-3569, 1996.
  20. PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Add. Contam.*, 13: 49-50, Supplement, 1996.
  21. POHLAND, A. E.; NESHEIM, S. & FRIEDMAN, L. Ochratoxin A. *Pure Appl. Chem.* 64: 1029-1046, 1992.
  22. RHÔNE-DIAGNOSTICS TECHNOLOGIES LTD. *ochaprep quantitative detection of ocratoxin A. Instructions for use*, Products codes: P14, P14B, Version P14/V2/ 11.08.97.
  23. SCOTT, P. M. & KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Add. Contam.*, 12: 591-598, 1995.
  24. SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. in: *Mycotoxins and phytoalexins*, Boca Raton, FL, SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K., 1991, p.13-31.
  25. SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B., Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice, and cassava, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68: 1128-1130, 1985.
  26. SPEIJERS, J.A. & VAN EGMOND, H.P. Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds, in: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, Paris, CREPPY, E.E; CASTEGNARO, M. & DIRHEIMER, G., 1993, p. 85 — 100.
  27. STEGEN, G. V. D.; JÖRRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VICENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J. & SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Add. Contam.*, 14: 211-216, 1997.
  28. STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chemical Toxicology*, 33: 341-355, 1995.
  29. TERADA, H.; TSOUBUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K. & SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 960-964, 1986.
  30. TRUCKSESS, M. W.; CHOU, J.P.; YOUNG, K. & PAGE, S.W. Determination and survey of ochratoxin A in barley, green coffee and roasted coffee. *FDA Science Forum Poster Abstract*, [<http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/forum97/97A30.htm>], 1997.
  31. TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K. & SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 540-542, 1988.
  32. VALENTA, H. & GOLL, M., Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Add. Contam.*, 13: 669-676, 1996.
  33. VAN EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. *Food Add. Contam.*, 13: 11-13, Supplement, 1996.26.
  34. VERARDI, G.; ROSNER, H. Some Reflections on Establishing a Community Legislation on Mycotoxins. *Natural Toxins*, 3: 337-340, 1995.
  35. ZIMMERLI, B. & DICK, R. Study to repeated Use of commercial immunoaffinity columns. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 87: 732-742, 1996.
  36. ZIMMERLI, B. & DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment, *Food Add. Contam.*, 6: 655-668, 1996.

Recebido para publicação em 25/03/1999

## COMPARAÇÃO ENTRE ELISA E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA NA QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM

Guilherme PRADO\*  
Marize Silva de OLIVEIRA\*

RIALA 06/871

PRADO, G & OLIVEIRA, M.S — Comparação entre Elisa e cromatografia em camada delgada na quantificação de aflatoxinas em amendoim. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 99-104, 1999

**RESUMO:** Um método imunoenzimático (ELISA) e a cromatografia em camada delgada (CCD) com comparação visual, foram comparados na determinação de aflatoxinas em amostras de amendoim cru naturalmente contaminado. Para níveis de aflatoxina total até 50 µg/Kg não houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Para valores de aflatoxinas total superiores a 50 µg/Kg, a técnica de ELISA foi estatisticamente equivalente à cromatografia em camada delgada ( $p < 0,001$ ) somente quando as amostras foram diluídas para obter níveis de aflatoxina total até o máximo de 50 µg/Kg. Não foram observados falsos positivos ou negativos por ELISA quando comparado com cromatografia em camada delgada.

**DESCRIPTORIOS:** amendoim; aflatoxinas; cromatografia em camada delgada; ELISA.

### INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que contaminam as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica.<sup>30</sup>

No Brasil, têm-se estudado a presença de aflatoxinas em vários alimentos de consumo humano, como amendoim, arroz, feijão, trigo, milho, mandioca, sendo que a maior contaminação com aflatoxinas ocorre em amendoim e milho.<sup>7,19,20,25,27</sup>

Para um controle e monitoramento eficientes, as indústrias e os laboratórios oficiais dos Ministérios da Saúde e Agricultura devem dispor de métodos analíticos de boa sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de uso, além de boa exatidão e precisão.<sup>23,24</sup>

A quantificação de aflatoxinas pode ser realizada por uma grande variedade de técnicas, sendo a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as mais utilizadas. A mais significativa vantagem da CCD é que é relativamente barata, fornecendo adequada resolução para um número considerável de amostras. A principal desvantagem é a falta de potencial para a automação e a natureza subjetiva da etapa de quantificação (para aqueles laboratórios que não possuem densitômetro). A metodologia para CLAE apresenta alta sensibilidade e um grande potencial para automação. Entretanto, requer equipamentos caros e pessoal altamente especializado para operação.<sup>18,22,31</sup>

Dificuldades associadas com CCD e CLAE na análise de micotoxinas têm levado ao desenvolvimento de métodos imunológicos rápidos, como o teste enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As vantagens

\* Fundação Ezequiel Dias — Divisão de Bromatologia e Toxicologia — Núcleo de Micologia e Micotoxinas — Rua Conde Pereira Carneiro, 80 — Gameleira — Belo Horizonte / MG — 30510-010. Fone: (031) 3719462 Fax: (031) 3719463 — E-mail: iommicol@funed.mg.gov.br

oferecidas envolvem redução do tempo de análise, procedimentos simples de extração e capacidade de processar um grande número de amostras em um tempo reduzido.<sup>4,11,14,16</sup> O teste ELISA detecta e amplifica a reação antígeno-anticorpo pela ligação covalente entre enzima-anticorpo ou enzima-analito, cuja presença é posteriormente determinada pela adição de enzima no substrato. A quantidade de substrato convertido a um dado tempo é indicativo da concentração original do composto a ser analisado.<sup>1,2,8</sup> No Brasil, apesar de alguns laboratórios de análise de micotoxinas, executarem a técnica de ELISA em seus procedimentos de rotina, seja como método de triagem ou de quantificação, existe uma deficiência de estudos comparativos com métodos oficiais ou com aqueles já tradicionalmente utilizados e recomendados.

O objetivo deste trabalho foi comparar técnicas de quantificação de aflatoxinas em amendoim em grão naturalmente contaminado: a cromatografia em camada delgada com quantificação visual, a mais utilizada no Brasil<sup>29</sup> e a técnica de ELISA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Substrato

As amostras de amendoim em grão (1Kg) foram previamente moídas, homogeneizadas e passadas em tamiz 20 mesh. Posteriormente, fez-se o quarteamento até aproximadamente 300 g e acondicionadas em frascos plásticos e guardadas em freezer até o momento da análise (- 15°C).

#### 2.1.2 Kit de ELISA

Foi utilizado o Kit Veratox para determinação quantitativa de aflatoxinas total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) da Neogen Corporation. Esse material foi armazenado a uma temperatura de 2-8°C, conforme instrução do fabricante, e utilizado dentro do tempo de validade (06 meses).

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Determinação de aflatoxinas por

##### Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica utilizada foi basicamente a descrita por VALENTE SOARES & RODRIGUES AMAYA<sup>28</sup> utilizada por um grande número de laboratórios no Brasil, e recomendado pelo Programa Nacional de Micotoxinas. A extração das aflatoxinas foi executada com amostras em duplicata, de acordo com o item 2.1.1, que foram colocadas em um copo de liquidificador com 270 mL de metanol e 30 mL de KCl a 4%. Após a mistura por 3

minutos em velocidade alta, filtrou-se em papel Whatman nº 4. Para purificação, adicionou-se 150 mL de sulfato de cobre a 10% e 50 mL de celite à 150 mL deste filtrado. Após homogeneizar, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 4. Esse segundo filtrado foi submetido a uma partição líquido-líquido, empregando-se alíquota de 150 mL do filtrado, 150 mL de água destilada e 10 mL de clorofórmio (duas extrações). A partir dos extratos clorofórmicos reunidos, transferiu-se 6 mL para um frasco âmbar. Seguiu-se a evaporação em atmosfera de nitrogênio até secura. Para a identificação e quantificação das aflatoxinas, o resíduo foi diluído em benzeno:acetonitrila (98:2), agitado por 1 minuto em ultrassom e aplicado em cromatoplaça de sílicagel G-60, de 250 mm de espessura e sem indicador fluorescente. O desenvolvimento da cromatografia foi feito em tolueno : acetato de etila : clorofórmio : ácido fórmico 90% (70:50:50:20) segundo GIMENO<sup>10</sup>. Após a corrida, a placa foi seca a 105°C por 10 minutos e examinada sob luz ultravioleta à 360 nm. A quantificação foi feita após comparação da intensidade das fluorescências das alíquotas da amostra, com a intensidade das fluorescências dos padrões de concentração conhecida. Os teores das aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  e  $G_2$  foram somados, obtendo-se valores de aflatoxina total.

#### 2.2.2 Determinação de aflatoxina por ELISA

A técnica utilizada foi um ensaio competitivo direto de ELISA que apresenta uma menor variabilidade na análise<sup>17</sup>. A extração das aflatoxinas foi feita em amostras de 50 g, em duplicata, preparadas como descrito no item 2.1.1, que foram colocadas em um copo de liquidificador com 250 mL de metanol a 70%, em água deionizada. Após a mistura por 2 minutos em alta rotação, foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1, recolhendo-se pelo menos 150 mL do filtrado.

Para aquelas amostras, cujos níveis de aflatoxinas, determinados pela técnica de cromatografia em camada delgada (item 2.1.1), foram superiores a 50 µg/Kg, que é o valor máximo da curva padrão de aflatoxina utilizado pelo kit de ELISA da Neogen, foram feitas diluições dos filtrados com Metanol 70%, a fim de se obter níveis de aflatoxina dentro da curva padrão (até 50 µg/Kg)<sup>17</sup>. Desta forma foram obtidos para essas amostras dois resultados de aflatoxina por ELISA: um sem e outro com diluição do extrato.

Para amostras com valores de aflatoxinas inferiores a 50 µg/Kg, foram seguidos diretamente as instruções do fabricante a partir do filtrado, obtendo-se portanto um único resultado pela técnica de ELISA.

#### 2.2.3 Análise estatística

Os valores de aflatoxinas obtidos pelas técnicas descritas, por apresentarem uma proporcionalidade entre

as médias e seus respectivos desvios padrões nos níveis acima de 50 µg/Kg e violação dos limites naturais entre as médias e desvios nos valores abaixo de 50 µg/Kg, sofreram uma transformação logarítmica para serem submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste t de Student a um nível de significância de 0,1%<sup>26</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de aflatoxina total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) das amostras de amendoim com valores inferiores a 50 µg/Kg estão apresentados na Tabela 1. Em 27 amostras, 8 mostraram-se negativas, tanto pelo método ELISA como pelo método CCD. Observa-se que não foram registrados falsos negativos e falsos positivos quando se compara as técnicas de CCD e ELISA.

Na Tabela 2 são mostradas as médias totais e os respectivos desvios padrões das duas metodologias empregadas, sendo que por ELISA a média geral foi menor quando comparada à CCD. Resultados idênticos foram obtidos por CHU *et al*<sup>9</sup>. Verificou-se também que não houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os níveis de aflatoxina total obtidos por ELISA e CCD, após análise de variância efetuada com os dados transformados (item 2.2.3). AZER & COOPER<sup>3</sup> compararam os resultados de aflatoxinas totais obtidos em amendoim e pasta de amendoim por ELISA e CLAE. Foi observado um coeficiente de correlação de 0,963 entre as duas técnicas, e o Test t de Student mostrou que não havia diferença significativa entre os resultados dos dois sistemas ( $p < 0,001$ ). Entretanto, falsos negativos foram observados na faixa de 2-4 µg/Kg. CHU *et al*<sup>9</sup> observaram também uma excelente correlação (0,91) entre níveis de aflatoxina  $B_1$ , quando foi quantificada em diversos produtos agrícolas (milho, amendoim) por ELISA e CCD.

No Brasil, a presença de aflatoxinas em alimentos é regulada pela Resolução No. 34/76 do Ministério da Saúde<sup>6</sup>, que estabelece 30 µg/kg para a soma das aflatoxinas  $B_1$  e  $G_1$ , e pela Portaria No. 183 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária<sup>5</sup>, que estabelece o limite máximo de 20 µg/kg, para a somatória das aflatoxinas  $B_1$ ,  $G_1$ ,  $B_2$  e  $G_2$  acompanhando o estabelecido pelos países do MERCOSUL<sup>13</sup>. Se seguirmos a legislação do Ministério da Agricultura e MERCOSUL teríamos uma correspondência de 92,6% entre os resultados apresentados por ELISA e CCD. Somente as amostras 6 e 7 da Tabela 1 estariam fora dos padrões legais se a metodologia utilizada fosse CCD. Pela técnica de ELISA essas amostras estariam aprovadas (menor que 20 µg/kg).

Tabela 1. Níveis de aflatoxina total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA).

AMOSTRA	AFLATOXINA TOTAL (µg/Kg)*	
	CCD	ELISA
1	14	19,5
2	2	6,5
3	2	3,3
4	5,5	4,7
5	5,5	6,3
6	30,5	11,5
7	24	10,5
8	39,5	53,5
9	4,5	3
10	8	2,6
11	1,6	3
12	9,5	6
13	8,5	5,5
14	1,6	4,7
15	8	6,6
16	5	5
17	3	6
18	2,5	2
19	50	49,6

\* Média de duplicata

Tabela 2. Média geral de aflatoxina total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA).

Método	AFLATOXINA TOTAL (µg/Kg)*	
	Média Total	Desvio padrão Total
CCD	8,64 a	13,9
ELISA	7,77 a	13,4

\* Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste t Student ao nível de 0,1% de probabilidade.

Os resultados de aflatoxina total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) e as médias e desvios totais das amostras de amendoim com valores superiores a 50  $\mu\text{g/Kg}$  estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Observando-se os valores médios de aflatoxina total entre os diversos tratamentos verifica-se que não há diferença significativa ao nível de 0,1%, entre as técnicas de CCD e ELISA com diluição. Entretanto, valores de aflatoxina obtidos por essas técnicas diferem significativamente com os níveis determinados por ELISA sem diluição ( $p < 0,001$ ). O fato da faixa de concentração da curva padrão da técnica de ELISA ser efetivamente de 5 a 50  $\mu\text{g/Kg}$ , quantificações fora deste intervalo possivelmente comprometem a exatidão das respostas obtidas. Esses resultados sugerem que em amostras com níveis elevados de contaminação, há uma maior competição entre o analito livre e o analito ligado a enzima com o anticorpo sensibilizado na cavidade de ELISA, podendo resultar em indicações de níveis falsamente menores de aflatoxina. Resultados idênticos foram obtidos por OLIVEIRA<sup>11</sup> quando aflatoxinas foram quantificadas em milho por ELISA e CCD.

Tabela 3. Níveis de aflatoxina total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA com e sem diluição).

Amostra	AFLATOXINA TOTAL ( $\mu\text{g/Kg}$ )*		
	CCD	ELISA c/dil.	ELISA s/dil.
20	440	512	283
21	161	93	27
22	727	436,5	170,5
23	602,5	777,5	272
24	53	45	10,5
25	573,5	244,5	157
26	821,5	810	352
27	192,5	85	52
28	152	75	4
29	458,5	572,5	281
30	119,5	92	31
31	613,5	800	229,5
32	1000,5	1135	268,5
33	1938	1010	510
34	1145,5	1545	374
35	260	222,5	123
36	653	795	294,5
37	232,5	337,5	173,5
38	89	96,5	28,5
39	65	95,5	61,5
40	834	587,5	485
41	229	322,5	232
42	275,5	279	283,5
43	118	77	73,5
44	2587	1465	807

\* Média de duplicata

Tabela 4. Média geral de aflatoxina total ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA).

Método	AFLATOXINA TOTAL ( $\mu\text{g/Kg}$ )*	
	Média Total	Desvio padrão total
CCD	573,7a	602,5
ELISA c/dil.	442,5a	442,5
ELISA S/dil.	223,4b	188,8

\* Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste t Student ao nível de 0,1% de probabilidade.

Os coeficientes de variação (CV) dos ensaios foram 28% e 7,9% para valores de aflatoxina total inferior e superior a 50  $\mu\text{g/Kg}$ , respectivamente. Os valores de CV encontrados estão próximos aos observados nos ensaios congêneres.<sup>9,12,15,21</sup>

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem a utilização do teste de ELISA para quantificação de aflatoxinas em amostras de amendoim com níveis inferiores a 50  $\mu\text{g/Kg}$ . Para valores superiores a 50  $\mu\text{g/Kg}$ , os extratos devem ser diluídos para a quantificação ou ELISA pode ser utilizado apenas como método de triagem. Entretanto, novos estudos devem ser executados com outros kits comerciais e testes de recuperação devem ser realizados com padrões em qualquer kit a ser utilizado, como uma rotina de controle de qualidade.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Saúde e CNPq pelo apoio financeiro.

PRADO, G & OLIVEIRA, M.S — Comparison between ELISA and thin layer chromatography in the quantification of aflatoxins in peanut. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 99-104, 1999

ABSTRACT: A method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a thin layer chromatography were compared to determine the aflatoxins in naturally contaminated peanut samples. For values of total aflatoxin concentration until 50 µg/Kg, a significant difference was not observed at the level of  $p < 0.001$ , when compared to the results obtained by the two methods. For values of total aflatoxin concentration higher than 50 µg/Kg, the ELISA method was only statistically equivalent to thin layer chromatography ( $p < 0,001$ ) when the samples were diluted at maximum level of 50 µg/Kg. No false positives and negatives were obtained by ELISA when it was compared with thin layer chromatography.

KEY WORDS: peanut; aflatoxins; thin layer chromatography; ELISA.

### REFERÊNCIAS

1. ALLEN, J. C. Thoughts for food. *Lab. Pract.*, 12: 10-12, 1986.
2. ALLEN, J. C.; SMITH, C. J. Enzyme-linked immunosorbent assay kits for routine food analysis. *Trends Biotechnol.*, 5: 193-199, 1987.
3. AZER, M.; COOPER, C. Determination of aflatoxins in foods using CLAE and a commercial ELISA system. *J. Food Protect.*, 54: 291-294, 1991.
4. BERNER, D. Aflatoxin: Test kit versus chemical methods. *Inform*, 3: 218-219, 1992.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria No. 183 do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. *Diário Oficial*, Brasília, 25 mar. 1996. Art. I Adotar Regulamento Técnico do MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho, aprovado pela Resolução No. 56/94 do Grupo Mercado Comum do Sul de 01 de janeiro de 1995.
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução No. 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Sec. I pt.I, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
7. BRIGIDO, B. M.; BADOLATO, M. I. C.; FREITAS, V. P. S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas — S. P., por aflatoxinas durante o ano de 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55: 85-90, 1995.
8. CHU, F. S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. *J. Food Protect.*, 47: 562-569, 1984.
9. CHU, F. S.; FAN, T. S. L.; ZHANG, G.-S.; XU, Y.-C.; FAUST, S.; McMAHON, P. L. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B<sub>1</sub> in agricultural commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 854-857, 1987.
10. GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62: 579-585, 1979.
11. HANSEN, T. J. Immunochemical methods for mycotoxin detection in food products. *Trends Food Sci. Technol.*, 1: 83-88, 1990.
12. HORWITZ, W.; ALBERT, R. The reliability of aflatoxin assays. *Quart. Bull. Assoc. Food and Drug Off. United States*, 46: 14-24, 1982.
13. MERCOSUL. Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas. [s.n.t.]. (Correspondência interna — MERCOSUL\GMC\Res no 56/94, 1994).
14. NEWSOME, W. H. Potencial and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 919-923, 1986.
15. OLIVEIRA, MARIZE SILVA. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e de ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. Dissertação. Mestrado em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. 1996. 106p.
16. PEREIRA, L. M. & TOLEDO, M. C. F. Micotoxinas: Impacto na saúde humana e sua detecção pelo método de ELISA. *Cad. Téc. Esc. Vet.*, 13: 5-27, 1995.
17. PESTKA, J. J. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71: 1075-1081, 1988.
18. PRADO, G. Metodologias analíticas: tendências internacionais x experiência latinoamericana. In: CRUZ, L. C. H. (ed) *Micotoxinas: perspectiva latinoamericana*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1996. p. 111-116.

19. PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. C. Níveis de aflatoxina em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. *Ci. Tecnol. Alim.*, 9: 138-147, 1989.
20. PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; FERREIRA, S. O. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim comercializado na região metropolitana de Belo Horizonte — MG. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15-17 JULHO, 1988, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998, CD-ROM, cbcta 108.
21. RAM, B. P.; HART, L. P.; SHORTWELL, O. L.; PESTKA, J. J. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B1 in naturally contaminated corn and cottonseed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 904-907, 1986.
22. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. CCD vs CLAE: uma análise crítica e comparativa. In: CRUZ, L. C. H. *Micotoxinas: perspectiva latinoamericana*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 59-77.
23. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Técnicas analíticas para micotoxinas. In: IV ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 245-247.
24. SABINO, M. Prevenção e controle de micotoxinas. In: IV ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 239-244.
25. SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciê. Cult.*, 45: 359-371, 1993.
26. SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada á experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
27. SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N.; CALDAS, E. D. Aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56: 49-52, 1996.
28. SOARES, L. M. V.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in brasilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 22-26, 1989.
29. VILDES, M. S. Metodologia analítica para micotoxinas. In: MOURA, N. R. (ed). *Micotoxinas em alimentos*. Florianópolis: Insular, 1998. p 83-93.
30. WHO (World Health Organization). *Mycotoxins*. Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria 11).
31. WILSON, D. M. Analytical method for aflatoxins in corn and peanuts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 308-312, 1989.

Recebido para publicação em 26/03/1999

## AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM ALIMENTOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

Eliana Badiale FURLONG\*  
Leonor Almeida De Souza SOARES\*  
Ana Paula VIEIRA\*\*  
Geraldine DADALT\*\*\*

RIALA 06/872

FURLONG, E. B. et al. — Aflatoxinas, Ocratoxina A e Zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul – Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 105-111, 1999

RESUMO: Foi realizado um levantamento de ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona em produtos alimentícios comercializados nas cidades de Rio Grande e Pelotas, RS. As amostras, produtos de arroz (47), milho (39) e trigo (79), foram coletadas em supermercados nos anos de 1996 e 1997. Foi empregado o multimetodo de camada delgada descrito por Soares (1987). A performance deste para cada tipo de produto estudado foi avaliada e os indicadores foram semelhantes aos da literatura para este tipo de método. Os resultados mostraram que 6,7% das amostras estavam contaminadas por micotoxinas. Os produtos de milho foram os que apresentaram níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> (32 µg.Kg<sup>-1</sup>) acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. Ocratoxina A foi encontrada em amostras de arroz (48 e 19 µg.Kg<sup>-1</sup>) e trigo (18 e 26 µg.Kg<sup>-1</sup>). Zearalenona esteve presente em amostras de milho (163 µg.Kg<sup>-1</sup>) e farinhas de trigo (105 e 97 µg.Kg<sup>-1</sup>).

DESCRITORES: aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona, arroz, trigo e milho

### INTRODUÇÃO

A motivação para as pesquisas em micotoxicologia, no Sul do Brasil como em outras regiões do mundo, decorrem do fato de que contaminação fúngica e a produção de substâncias tóxicas (micotoxinas) são, direta ou indiretamente, responsáveis por grandes prejuízos na agropecuária regional. Diretamente por alterarem a qualidade dos grãos, do ponto de vista agrônomo e tecnológico, e indiretamente, por provocarem a diminuição do

crescimento, da capacidade reprodutiva e até a morte de animais que consomem os grãos contaminados.<sup>5,6,14</sup>

A literatura menciona que para os humanos o maior problema decorre da ação crônica das toxinas fúngicas, pois além da alteração do crescimento em jovens e crianças, ocasionam distúrbios neurológicos, imunológicos e aparecimento de câncer em alguns casos.<sup>3,10,13</sup>

Muitos levantamentos sobre a ocorrência de micotoxinas vem sendo realizados no país, mas ainda há necessidade de informações sobre produtos parcialmente processados e muito empregados em preparos indús-

\* Dr<sup>a</sup> Ciência de Alimentos

\*\* Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial

\*\*\* Bolsista de Iniciação Científica CNPq — Realizado no LABORATÓRIO DE MICOTOXINAS — DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE — Rua Eng. Alfredo Huch, 475 — fone: 311900 r 147. Fax : 0532 329716 CEP: 962001-900 — Rio Grande-RS — Email: dqmebf@super.furg.br

triais e domésticos, tais como farinhas de trigo, derivados de arroz e de milho. Isto porque a contaminação destes é aleatória e dependente de uma série de fatores bióticos e abióticos, nem sempre previsíveis.<sup>1,2,9,11,12</sup>

A informação sobre a qualidade dos alimentos consumidos pela população poderia vir a colaborar com a ação preventiva, que vem sendo desencadeada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, no sentido de oferecer alimentos seguros à população. Esta também poderia indicar a necessidade de possíveis correções no sistema de produção dos estabelecimentos rurais e industriais de transformação dos alimentos.

Dentre as dificuldades existentes para que estejam disponíveis dados sobre a situação dos produtos comercializados pode-se destacar a metodologia analítica, os laboratórios com pessoal treinado e o custo das determinações e a amostragem<sup>14</sup>.

Assim, pensando em otimizar os recursos financeiros disponíveis e visando contribuir para a tomada de medidas efetivas, no sentido de prevenir danos à saúde pública, o objetivo deste trabalho foi realizar sistematicamente levantamento de ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona em derivados de trigo, arroz e milho, destinados ao consumo humano, comercializados na região sul do Rio Grande do Sul, nos anos de 1996 e 1997.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostragem

A coleta de amostras realizou-se no ano de 1996 e 1997 nas lojas de três grandes redes de supermercados existentes nas cidades de Rio Grande e Pelotas, região sul do Rio Grande do Sul. Antes do início da coleta foram identificadas as três marcas mais consumidas de arroz branco, parboilizado e integral; de milho para pipoca, para canjica, fubá e farinhas de trigo especial, integral e farelo de trigo. Os farelos de arroz, por não estarem disponíveis no comércio, foram tomados em diferentes engenhos da região.

Em cada estabelecimento foram coletados um número de pacotes de um quilograma de cada produto de cada marca que representassem aproximadamente 0,5% do total disponível nas prateleiras do estabelecimento no momento da coleta.

Após cada amostragem os produtos de mesmo tipo e marca, provenientes de diferentes pontos de coleta, foram misturados para formar um lote, que posteriormente era quarteado para a tomada da amostra analítica.

Foram formados 79 lotes de derivados de trigo constituídos por farelo (9), farinha integral (21) e farinha

especial (49). Os derivados de milho formaram 39 lotes constituídos por milho de pipoca (9), fubá (21) e milho para canjica (9). Derivados de arroz coletados compuseram 47 lotes formados por arroz integral (12), arroz parboilizado (12), arroz branco (15) e farelo (8).

### 2. Avaliação da eficiência do método analítico

O multimétodo de camada delgada, proposto por Soares<sup>14</sup>, foi avaliado quanto a sua eficiência para o laboratório em que se realizou este trabalho.

Foram testadas a recuperação em três níveis, a repetibilidade e o limite de detecção para aflatoxina B<sub>1</sub> (10,20,50 µg.Kg<sup>-1</sup>), ocratoxina A (15, 25,50 µg.Kg<sup>-1</sup>) e zearalenona (50, 100, 150 µg.Kg<sup>-1</sup>) em um representante de cada tipo de matriz estudada. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para representar os produtos derivados do arroz, do trigo e do milho foram utilizados respectivamente o arroz branco, a farinha de trigo especial e o fubá.

### 3. Triagem e quantificação

Foram utilizadas placas prontas de sílica gel G 60 com 0,25 mm de espessura (Wathman) como fase estacionária. Para eluição das toxinas foi empregado o sistema solvente tolueno : acetato de etila : ácido fórmico

(5 : 3 : 0,5) para triagem e para a quantificação o mesmo com o ácido fórmico na proporção de 1. A visualização da presença de toxinas padrão e nos extratos de amostras foi sob luz ultravioleta de ondas longas e curtas.

Para confirmação foram empregadas co-cromatografia e derivação química<sup>14</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Amostragem

Em vista da disponibilidade de recursos financeiros a amostragem enfatizou aqueles produtos que são consumidos em maior quantidade e frequência, sempre com o cuidado de garantir a representatividade das amostras. Os farelos de trigo e arroz, pouco consumidos em alimentação humanas, foram analisados pelo risco de contaminação direta e indireta que oferecem.

Os lotes formados foram compostos por produtos de mesmo tipo e marca, e, sempre que possível com a mesma data de fabricação. A grande dificuldade com este procedimento foi encontrar todos os produtos e marcas em todas as ocasiões em que se realizavam as coletas.

## Eficiência do Método Empregado

A eficiência do multimétodo de Soares<sup>14</sup>, que vem sendo largamente empregado pelos laboratórios nacionais por sua sensibilidade, precisão, exatidão, simplicidade e custo acessível; foi avaliada, pois para cada tipo de produto a presença de interferentes e de falsos positivos em função de sua matriz. Os reagentes e os procedimentos do analista também influenciam os resultados e precisam estar considerados quando se pretende implantar uma rotina de avaliação de ocorrência de micotoxinas.

Na Tabela 1 estão os resultados médios de três repetições do estudo da recuperação; os coeficientes de variação e os limites de detecção para aflatoxina B<sub>1</sub>, ocratoxina A e zearalenona em arroz branco, farinha de trigo especial e fubá que não se apresentaram contaminados durante a triagem.

A micotoxina de mais altos limites de detecção foi a zearalenona, em termos de repetibilidade a aflatoxina B<sub>1</sub> foi a de menor variabilidade, como vem sendo relatado por outros autores que tem utilizado esta metodologia no país.<sup>2, 9, 11, 14</sup>

Tabela 1. Recuperação, coeficiente de variação e limite de detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>, ocratoxina A e zearalenona em diferentes produtos\*

	Arroz branco	Farinha de trigo	Fubá
<b>Recuperação (%)</b>	Média 3 níveis (CV)	Média 3 níveis (CV)	Média 3 níveis (CV)
Aflatoxina B <sub>1</sub>	84 (5,1%)	91,5 (4,3%)	83 (5,8%)
Ocratoxina A	78 (6,3%)	82,7 (5,6%)	77 (3,8%)
Zearalenona	75 (6,4%)	88 (4,3%)	85 (6,0%)
<b>Coef. Variação (%)</b>			
Aflatoxina B <sub>1</sub>	18	12	17
Ocratoxina A	19	16	23
Zearalenona	20	21	18
<b>Lim. Detecção µg.Kg<sup>-1</sup></b>			
Aflatoxina B <sub>1</sub>	2,5	1,9	4,0
Ocratoxina A	6,0	6,0	8,5
Zearalenona	45	40	32

CV: coeficiente de variação entre os níveis de contaminação

\*média de três repetições

O método apresentou melhor eficiência quando aplicado a farinhas de trigo. No caso do arroz os resultados dos indicadores de eficiência do método foram atribuídos a maior dificuldade em se uniformizar a granulometria da amostra. Na etapa de triagem, o fubá apresentava muitos interferentes que dificultaram a determinação das micotoxinas. No aspecto geral todos os indicadores de eficiência testados não diferiram dos mencionados em literatura.

## Resultados

O arroz e seus derivados estão entre produtos agropecuários de maior volume de produção e comercialização na região sul do Rio Grande do Sul. Os grãos de

arroz são beneficiados para obtenção de arroz integral, branco e parboilizado. O farelo resultante destes processos é utilizado para extração de óleo. Pode-se estimar a partir da diversidade de produtos e dos hábitos de consumo a grande exposição da população a substâncias tóxicas, no caso destes produtos estarem contaminados.

A agroindústria, que processa grãos de trigo, está também, entre as que mais fornecem produtos destinados ao consumo humano. Diariamente são consumidos diversos produtos preparados em ambiente doméstico ou comercial com farinhas comum, especial e integral. Os tratamentos efetuados nos grãos, para dar origem a estes insumos, removem parcialmente a contaminação porém manuseios posteriores ao beneficiamento, tais como embalagem, armazenamento e comercialização podem propiciar a recontaminação.

O milho, dentre os cereais estudados, é consumido na forma de grão principalmente na alimentação animal. Beneficiado é consumido na forma de farinhas de várias granulometrias. Milho para pipoca e canjica são principalmente consumidos na alimentação infantil, sem mui-

tos tratamentos que propiciem grande diminuição nos níveis de micotoxinas, quando presentes no grão.

Na Tabela 2 aparecem os resultados da triagem e quantificação das micotoxinas aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona.

Tabela 2. Amostras suspeitas e contaminadas dos produtos estudados

Tipo de Produto	Micotoxina Suspeita	Amostras Confirmadas	Níveis Detectados $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
Farelo de arroz	Aflatoxinas (4)	1	48
	Ocratoxina A (2)	1	35
Arroz Integral	Aflatoxina B <sub>1</sub> (3) Ocratoxina A (2)	nd	—
Arroz Parboilizado	Aflatoxina B <sub>1</sub> (2) Ocratoxina A (2)	nd	19
Arroz Branco	Zearalenona (2) Ocratoxina A (2)	nd	—
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>3</b>	
Farelo de trigo	Ocratoxina A (4)	1	18
	Zearalenona (3)	1	105
Farinha integral	Aflatoxina B <sub>1</sub> (3)	nd	—
	Zearalenona (1)	1	97
Farinha especial	Zearalenona (2)	nd	—
	Ocratoxina A (2)	1	26
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	
Milho pipoca	Aflatoxina B <sub>1</sub> (3)	1	32
	Aflatoxina G <sub>1</sub> (3)	nd	
	Ocratoxina A (2)	nd	
Fubá	Aflatoxina B <sub>1</sub> (3) Aflatoxina B <sub>2</sub> (1)	1	30
Canjica	Aflatoxinas (3) Zearalenona (2)	1 B <sub>1</sub>	163
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	

— nd: não detectado

A tabela acima mostra farelos de arroz e de trigo contaminados. Os farelos são constituídos principalmente pelas porções mais externas dos grãos, a mais exposta a contaminação fúngica, além disso por se tratar de um subproduto os cuidados no seu manuseio não seguem condições rígidas de higiene <sup>1</sup>.

A contaminação do arroz parboilizado poderia ser justificada pelo fato que este foi submetido a um processo de encharcamento prévio ao descascamento que poderia propiciar a migração de micotoxinas de porções mais externas para o interior do grão <sup>4</sup>.

Em derivados de grãos de milho a micotoxina mais frequentemente detectada foi a aflatoxina B<sub>1</sub>, inclusive em níveis superiores aos permitidos pela Resolução 34/76, do Ministério da Saúde<sup>8</sup> e Portaria 183 do Ministério da Agricultura<sup>7</sup>, o que vem sendo frequentemente relatado na literatura <sup>2,9,11</sup>.

É interessante observar que o número de produtos falsos positivos foi alto (30, 9%) no conjunto de amostras analisadas, porém considerando cada tipo de produto estudado o milho se destacou com 28,2% de amostras suspeitas de contaminação. Os derivados de trigo foram os que apresentaram o menor número de falsos positivos,

o que já era esperado pelos resultados dos testes de avaliação da metodologia.

Os produtos analisados neste trabalho não são muito frequentes nos levantamentos de outros países, pois trata-se de uma amostragem regional, porém os níveis e a frequência da ocorrência podem ser considerados baixos<sup>12</sup>. Cabe salientar que na maioria dos relatos são analisados produtos pouco processados, diferente deste caso em que foram coletados alimentos prontos para preparo doméstico ou industrial.

Em qualquer caso a presença de micotoxinas em produtos destinados ao consumo humano coloca em risco a segurança da saúde da população e deveriam ser tomadas providências no sentido de minimizar ou alertar sobre o problema, sempre salientando o aspecto crônico do efeito da contaminação.

Os resultados demonstram também a necessidade de um controle mais rígido da qualidade dos produtos alimentícios, no sentido da contaminação por micotoxinas e suas transformações ao longo de toda a cadeia produtiva.

A Figura 1 ilustra a distribuição percentual de ocorrência de micotoxinas nos produtos estudados.

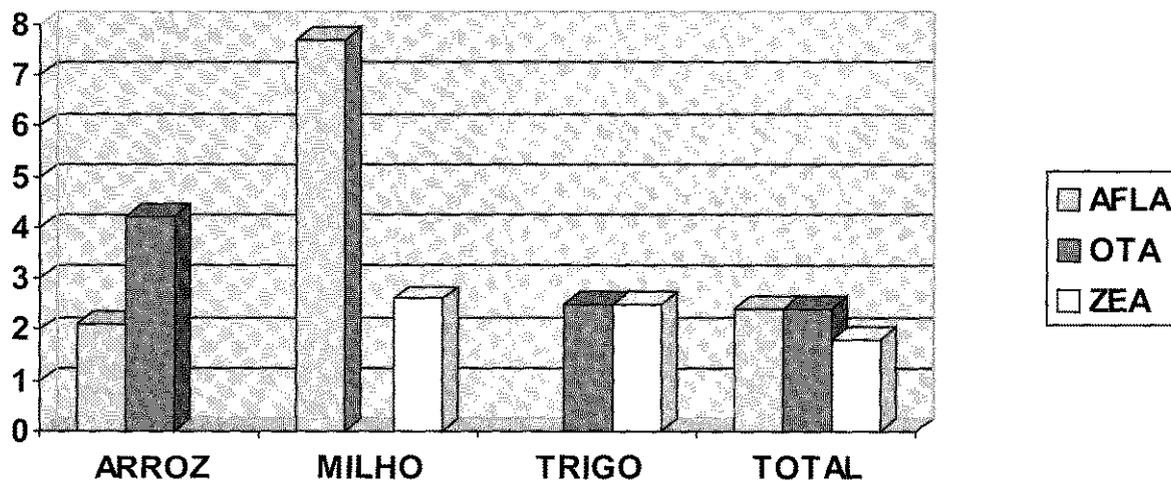


Figura 1 - Distribuição percentual de micotoxinas nos diferentes produtos

A figura acima mostra que não houve ocorrência simultânea de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em todas as amostras estudadas e que no conjunto de produtos avaliados a ocorrência é inferior a 3%.

### CONCLUSÕES

O multimétodo de camada delgada para detecção das micotoxinas analisadas apresentou eficiência adequa-

da para todas as matrizes deste levantamento, pois os valores de recuperação foram superiores a 75%, coeficientes de variação entre 12 e 23% e limites de detecção entre 1,9 µg.Kg<sup>-1</sup> (aflatoxina B<sub>1</sub>) e 45 µg.Kg<sup>-1</sup> (zearalenona) .

Os resultados do levantamento levam a concluir que, no ano de 1996 e 1997 no comércio da região sul do Rio Grande do Sul:

— o maior número de falsos positivos ocorreu em amostras de milho (56%);

— um total de 6,7% das amostras avaliadas estavam contaminadas pelas micotoxinas objeto deste estudo;

— os insumos derivados de milho (15,4%) são os mais contaminados, seguidos pelos de arroz (5%) e de trigo (5%);

a única micotoxina, detectada em níveis acima do permitido pela legislação do Ministério da Saúde e da

Agricultura, foi a aflatoxina B<sub>1</sub> em farelo de arroz (48 µg.Kg<sup>-1</sup>) e milho para pipoca (32 µg.Kg<sup>-1</sup>).

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

RIALA 06/872

FURLONG, E. B. et al. — AFLATOXINS, OCHRATOXIN A AND ZEARELENONE IN FOODS OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL — Rev. Instituto Adolfo Lutz 58(2): 1999

ABSTRACT: A survey about occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ochratoxin A and zearalenone in food products commercialized in the cities Rio Grande (RS) and Pelotas (RS) was conducted. The samples — products of rice (47), corn (39) and wheat (79) — were purchased on the supermarkets during 1996 and 1997. Simultaneous method of thin layer chromatograph described by Soares (1987) was used. The performance for each studied matrix was evaluated and it was in conform to literature. The results showed that 6,7% of samples was contaminated with analysed mycotoxins. Corn products had aflatoxin B<sub>1</sub> levels that exceeded Brazilian legislation ((32 µg.Kg<sup>-1</sup>). Ochratoxin A was founded in rice products (48 e 19 µg.Kg<sup>-1</sup>) and wheat (8 e 26 µg.Kg<sup>-1</sup>). Zearalenone was present in corn samples (163 µg.Kg<sup>-1</sup>) and wheat meals (105 e 97 µg.Kg<sup>-1</sup>).

KEY WORDS: aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone, rice, corn, wheat.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADIALE-FURLONG & SOARES, L.M.V. Trichothecenes in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Add. and Contaminants*, 12(5):683-688, 1995
2. BALDISSERA, M. A. ; SANTURIO, J.M. ; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C. A. & SCHIMIDT, C. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil – parte II. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 53 (1/2): 5-10, 1993
3. BULLERMAN, L.B.; SCHOEREDER, L.L. & PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. *Journal Food Protection* (47)8:637-646, 1984.
4. COELHO, C.S.P. Migração de Micotoxinas durante o processo de parboilização do arroz. Tese apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 1998, 106p.
5. HENNIGEN, M.R. E DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in grain (maize) used for animal nutrition in Rio Grande do Sul. IN: *Anais do VII Encontro Nacional de Micotoxinas*, São Paulo, SP, 1992.
6. MEIRELLES, M.C.A.; CORREA, B.; FISCHMAN, O.; GAMBALE, W. & PAULA, C.R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. *Mycopathology*, 127: 183-188, 1994.
7. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Portaria nº 183 de 21 de março de 1996, publicada pelo Diário Oficial da União de 25 de março de 1996, Seção I, pag 4929.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE: Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 34/76, publicada no Diário Oficial da União em 19 de janeiro de 1977.
9. NORDIN, N.S.D. *Deteção de aflatoxinas e zearalenona em milho (Zea maiz) destinados a alimentação animal*. Tese apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995, 89p.
10. OMER, R.E.; IDRIS, M.O.; KADARU, M.Y.; BAKKERM N,U.; VANT VEER, P; KOK, J.; HOOGENBOOM, R.L.A.P. & POLMAN, T.H.G.

- Aflatoxin and Liver Cancer in Sudan, *Nutrition and Cancer* 32(3):174-180, 1998
11. PICH, P. H. Detecção de aflatoxinas em produtos derivados de milho comercializadas na região de Porto Alegre. Tese apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998, 112p.
  12. PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds — na updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire; Mycotox 98 Symposium International, Mycotoxins in Food Chain*, Toulouse, France, 1998.
  13. SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; ALMEIDA, S.H.E. et alii. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. IN: *Anais do VII Encontro Nacional de Micotoxinas*, SP. p14, 1995.
  14. SOARES, L.M.V. *Micotoxinas: Um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas*, SP. (Tese de Doutorado), FEA — UNICAMP; 1987.
- Recebido para publicação em 01/04/99

## ESTUDO DA VARIAÇÃO DO TEOR DE NITRITOS E NITRATOS EM EMBUTIDOS COLONIAIS: POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE PÚBLICA

Marilena TURRA<sup>1</sup>  
Marco A. Záchia AYUB<sup>2</sup>

RIALA 06/873

TURRA, M. & AYUB, M.A.Z. — Estudo da variação do teor de nitritos e nitratos em embutidos coloniais: Possíveis implicações para a Saúde Pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 113-120, 1999.

**RESUMO:** Nitratos e nitritos são aditivos largamente utilizados em produtos cárneos, por contribuírem para a fixação da cor róseo-avermelhada da carne curada, um fator altamente desejável do ponto de vista sensorial, além de possuírem comprovada ação bacteriostática. Estes conservantes apresentam, entretanto, efeitos tóxicos à saúde humana, sendo seu uso e controle objeto de pesquisa no mundo inteiro. No Brasil, são abundantes os pequenos fabricantes de embutidos “coloniais” (uma designação regional), que se caracterizam por métodos artesanais de fabricação, quase sempre sem um controle técnico quanto às especificações dos produtos. Neste trabalho, foi investigada a variação quantitativa destes conservantes praticada por estes produtores. A cidade de Blumenau foi escolhida para a realização do levantamento quantitativo destes compostos, porque constitui-se em uma localidade com forte tradição na fabricação de embutidos cárneos. Foram escolhidos 9 produtores selecionados aleatoriamente dentre os 18 cadastrados pelo Serviço Municipal de Inspeção daquela cidade. Obteve-se a média semanal das amostras de lingüiças defumadas de cada produtor individualmente. O experimento estendeu-se por três semanas e foi possível observar uma significativa heterogeneidade, sem um critério técnico na utilização destes aditivos, por parte dos produtores. Tanto para nitritos, como para nitratos, observou-se ainda que a quantidade utilizada ficou muito abaixo dos valores recomendados pela legislação, implicando em possíveis riscos à saúde pública e redução da vida-de-prateleira dos produtos.

**DESCRIPTORES:** Nitritos; Nitratos; Aditivos Alimentares; Saúde Pública; Embutidos Artesanais

### INTRODUÇÃO

Nitritos e nitratos são aditivos tradicionalmente utilizados na fabricação de diversos alimentos e, em especial, em embutidos e carnes curadas devido às suas propriedades de conservação. Os nitritos combinam-se com a mioglobina da carne, dando origem ao pigmento oxidonitrosomioglobina, responsável pela cor avermelhada

das carnes curadas<sup>7</sup>, e retardam a oxidação de lipídeos, fatores sensoriais essenciais para a aceitação destes produtos.<sup>1,2,12</sup> Além disso, estes aditivos possuem comprovada atividade bacteriostática, notadamente sobre bactérias do gênero *Clostridium*, especialmente em alimentos de baixo pH, o que contribui para a preservação destes alimentos, evitando riscos de envenenamentos alimentares.<sup>6,18</sup> Seus usos como aditivos para estes fins estão bem

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), SC- Médica Veterinária (UFPEL) –Especialista em Vigilância Sanitária (Fund. Osvaldo Cruz)  
E-mail: marilennaturra@zip.com.br

<sup>2</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil; E-mail: mazayub@vortex.ufrgs.br

documentados.<sup>9,13,18</sup> Apesar disto, inúmeros estudos demonstram que nitritos e nitratos sofrem reações de nitrosação e decompõem-se gerando nitrosaminas, compostos cuja toxicidade é bem documentada, estando seu consumo excessivo possivelmente associado ao surgimento de câncer gástrico e outras formas de câncer.<sup>1,2,5,8,10,11,14,19</sup> Portanto, a utilização destes aditivos em alimentos é rigorosamente controlada por legislação em todo o mundo. No Brasil, os limites do uso de aditivos são regulamentados pela Resolução n.º 4 de 24 de novembro de 1988 do Ministério da Saúde<sup>1</sup>, sendo estabelecido o limite de 200 ppm de nitrito em produtos cárneos curados (exceto o charque) e o limite de 500 ppm de nitrato. Desta forma, um controle rigoroso da utilização de nitritos e nitratos em carnes curadas e embutidos é necessário do ponto de vista de saúde pública. Em nosso país, existe um grande número de pequenos produtores rurais de embutidos que, muito embora, na maioria dos casos, estejam regularmente registrados junto aos órgãos de inspeção locais, regionais ou federais, carecem de condições técnicas e/ou informações que os permitam utilizar corretamente aditivos e outros elementos de formulação. Esta prática implica em potencial risco à saúde pública, uma vez que seus produtos — com o forte apelo mercadológico de “*produtos coloniais*” — são bastante consumidos pela população em geral.

Neste trabalho objetivou-se avaliar quantitativamente a prática da adição de nitritos e de nitratos em embutidos coloniais defumados produzidos artesanalmente. Como modelo de estudo, foi escolhida a cidade de Blumenau, SC, para a realização do levantamento quantitativo destes compostos, porque constitui-se em uma localidade tradicionalmente produtora de embutidos cárneos. Com os resultados obtidos, pode-se inferir sobre a necessidade de futuros estudos em outras localidades do país e, mais importante, estabelecer uma rede de informações que auxilie os produtores sobre o uso correto — quantitativa e qualitativamente — de aditivos permitidos por lei.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Amostragem.** A experimentação prática foi efetuada com produtores da região de Blumenau, SC, por tratar-se de uma região com forte tradição na confecção de embutidos cárneos e defumados. Os produtores foram escolhidos aleatoriamente, perfazendo um total de 9 fabricantes (n=50%) dentre os cadastrados pelo Serviço Municipal de Inspeção daquela cidade. O produto escolhido para a investigação foi a lingüiça defumada porque esta apresenta uma vida-de-prateleira estimada empiricamente em 15 dias pelos produtores, quando mantida à

temperatura ambiente. Tal fato estimularia o produtor a utilizar concentrações maiores de nitritos e de nitratos.

Cada produtor contribuiu com três amostras por lote, produzido semanalmente. As amostragens foram feitas aleatoriamente pelos autores, na própria indústria.

As peças individuais de lingüiças suínas defumadas possuíam peso médio de 200g. As condições de coleta e transporte sofreram poucas oscilações nos períodos compreendidos entre cada análise, ou seja, durante as três semanas do experimento o procedimento rotineiro de coleta de amostras para análise físico-química foi o mesmo. Imediatamente após à amostragem, as lingüiças eram levadas ao laboratório onde as análises eram iniciadas no mesmo dia.

Para que não houvesse comprometimento entre as marcas de cada produto, sua identificação junto ao laboratório do Ministério da Agricultura (São José, SC), foi feita por números compreendidos entre 1 e 9.

Foram efetuadas três coletas, em 3 semanas consecutivas. O total de produtos analisados foi de 81 (oitenta e um).

**Preparo das amostras.** Foram moídas e homogeneizadas 200 g da amostra, operando com suficiente rapidez, para evitar que o produto desidratasse, sendo analisadas imediatamente.

**Método de Determinação de Nitratos e Nitritos.** A metodologia empregada seguiu rigorosamente os métodos analíticos do Ministério da Agricultura<sup>3</sup> e os descritos por SENZEL & REYNOLDS<sup>15</sup> e por TRUGO & LASZLO<sup>20</sup> com detalhes sobre os procedimentos e o preparo das soluções de trabalho. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os nitritos e nitratos foram extraídos em meio aquoso, e identificados por espectrofotometria, utilizando-se o Reativo de Zambelli.<sup>3,15</sup> Os nitratos foram reduzidos a nitritos através da passagem do filtrado por uma coluna de cádmio. Para quantificar os nitratos, obteve-se uma diferença entre nitritos totais e iniciais. Para cada determinação, uma curva padrão foi construída utilizando-se soluções padrão de NaNO<sub>3</sub>. Os resultados finais foram apresentados como ppm de nitritos ou nitratos em relação ao produto integral. Os gráficos representam a média de três determinações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Análise da variação do conteúdo de nitritos.**

Os gráficos apresentados nas Figuras 1, 2 e 3 representam os resultados obtidos para a análise do teor de nitritos dos nove produtores (n=50%) de lingüiça defumada para um período de três semanas. É possível obser-

var uma grande variabilidade no critério de utilização de nitritos entre os produtores, com os níveis variando em mais de 22 vezes entre si (produtores 5 e 7) e em até 4 vezes para o mesmo produtor em semanas diferentes (produtor 7). Este fato demonstra uma falta de metodologia empregada na fabricação de produtos embutidos coloniais, com conseqüentes prejuízos à qualidade do produto e levantando uma preocupação quanto aos riscos à saúde pública advindos desta prática. Pode-se observar claramente que, mesmo o produtor 5, que apresentou os níveis mais altos de nitrito em todas as amostragens ( $\text{ppm NO}_2 = 32,92 \pm 10,65$ ) está muito aquém do limite permitido pela legislação brasileira, que é de 200 ppm. Embora níveis reduzidos de nitritos possa representar uma melhoria quanto à questão dos efeitos tóxicos e carcinogênicos associados a estes aditivos,<sup>5,11,14</sup> sua baixa concentração pode representar um sério risco de não fornecer as características de conservação esperadas, com uma possível diminuição da vida-de-prateleira destes produtos. Além disso, também pode aumentar os riscos de envenenamento alimentar causado pelo desenvolvimento de bactérias potencialmente perigosas, especialmente *C. botulinum*. Este fato é particularmente importante no Brasil devido às condições de higiene praticadas por pequenos produtores, associados às temperaturas de estocagem, transporte e comercialização, nem sempre adequadas. Nos Estados Unidos, o teor de nitritos em embutidos reduziu em cerca de 80% nos últimos anos, sendo hoje de cerca de 15 ppm para produtos similares aos do escopo deste trabalho.<sup>6</sup> Comparado com este valor, oito dos nove produtores (excetuando o de número 5), apresentaram teores médios de nitrito bem inferiores ( $\text{ppm NO}_2 = 1^{\text{a}} \text{ sem.: } 5,74; 2^{\text{a}} \text{ sem.: } 7,25; 3^{\text{a}} \text{ sem.: } 4,07$ ). É importante notar ainda, que a redução de nitrí-

tos nos produtos americanos foi acompanhada paralelamente pelo aumento do teor de ascorbatos e pela melhoria dos processos produtivos, nenhuma destas práticas sendo observadas para o universos amostrado.

#### Análise da variação do conteúdo de nitratos.

Na análise do teor de nitratos a variabilidade de critérios adotados pelos produtores também ficou evidenciada, como demonstram os resultados grafados nas Figuras 4,5 e 6, embora o perfil de variabilidade tenha sido bastante diferente daquele observado para o caso de nitritos.

Observou-se uma variabilidade de até trinta vezes a diferença entre o maior e o menor valor medido (produtor 1, 2ª sem. e produtor 9, 1ª sem., respectivamente). Os resultados também acusaram grandes variações para um mesmo produtor, entre semanas diferentes. Assim, por exemplo, os produtores 1 e 7 apresentaram as maiores variações, com níveis de nitratos oscilando em cerca de 24 e 15 vezes respectivamente, comparando-se os menores e maiores teores. Não obstante à grande variação do teor de nitratos, seus valores sempre ficaram aquém do limite máximo permitido pela Resolução Normativa nº 4 de 24 de Novembro de 1988 do Ministério da Saúde, que fixa o valor máximo de 500 ppm para este conservante. Os resultados obtidos neste trabalho contrastam com os publicados por SOUZA et al<sup>16</sup> e TAVARES et al<sup>17</sup> para amostras de embutidos do Estado de São Paulo pois os níveis de nitrito e nitratos encontrados naqueles estudos foram sempre superiores aos observados por nós e, em alguns casos, estavam acima do permitido pela legislação brasileira. Os resultados obtidos para os níveis de nitratos reforçam as observações feitas anteriormente quanto à qualidade das práticas produtivas deste tipo de industrialização.

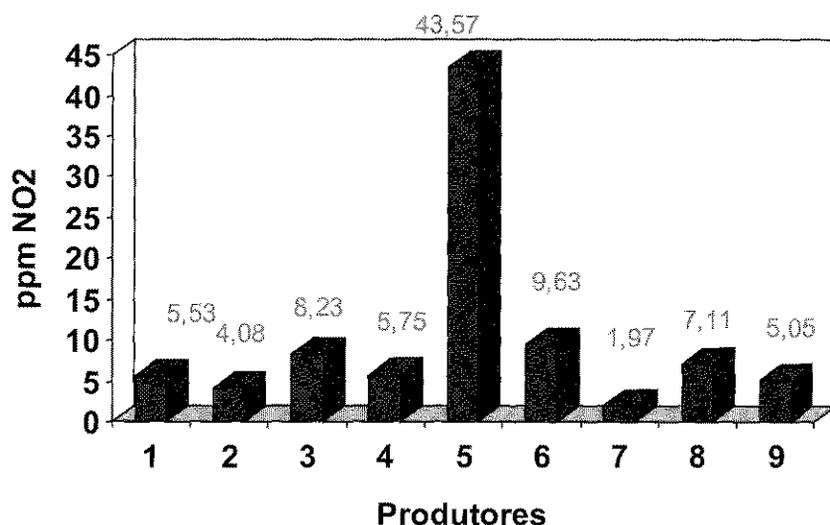


Figura 1 — Análise de variação do conteúdo de nitritos em lingüiça defumada — 1ª semana. Resultados representam a média de 3 amostras por produtor, numerados de 1 a 9. Valores dados em ppm NO<sub>2</sub>.

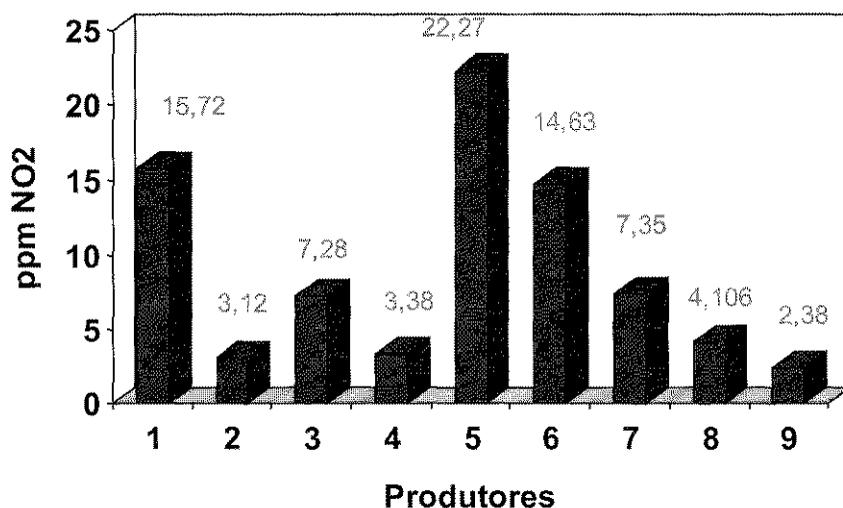


Figura 2 — Análise da variação do conteúdo de nitritos em lingüiça defumada — 2ª semana. Resultados representam a média de 3 amostras por produtor, numerados de 1 a 9. Valores dados em ppm NO<sub>2</sub>.

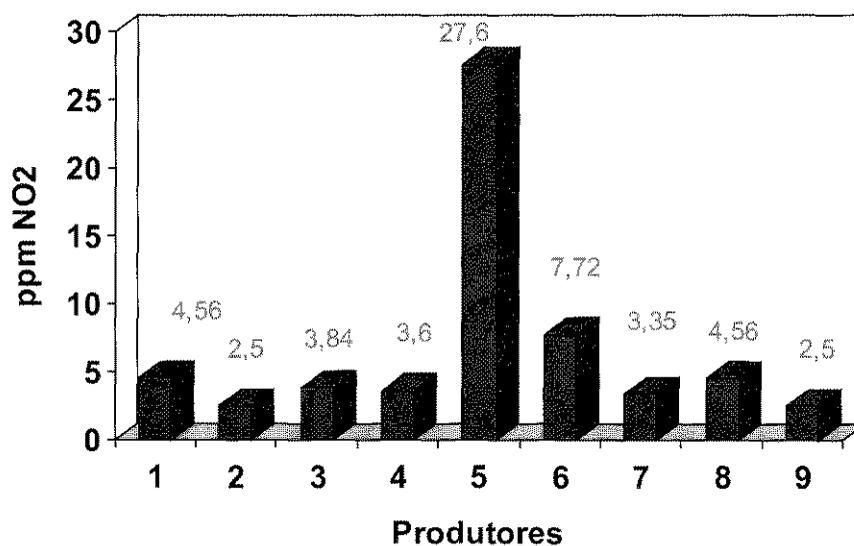


Figura 3 — Análise de variação do conteúdo de nitritos em lingüiça defumada — 3ª semana. Resultados representam a média de 3 amostras por produtor, numerados de 1 a 9. Valores dados em ppm NO<sub>2</sub>.

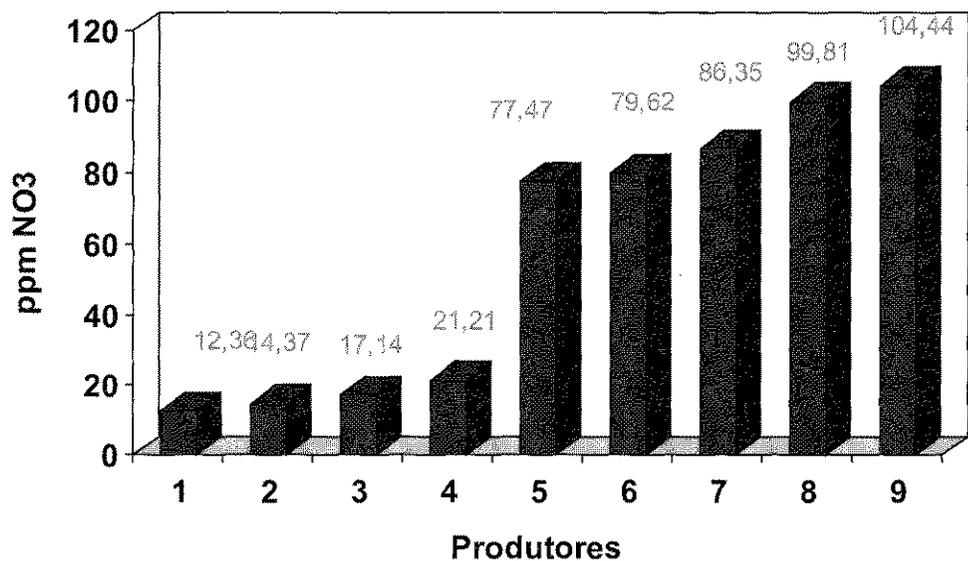


Figura 4 — Análise de variação do conteúdo de nitratos em lingüiça defumada — 1ª semana. Resultados representam a média de 3 amostras por produtor, numerados de 1 a 9. Valores dados em ppm NO<sub>3</sub>.

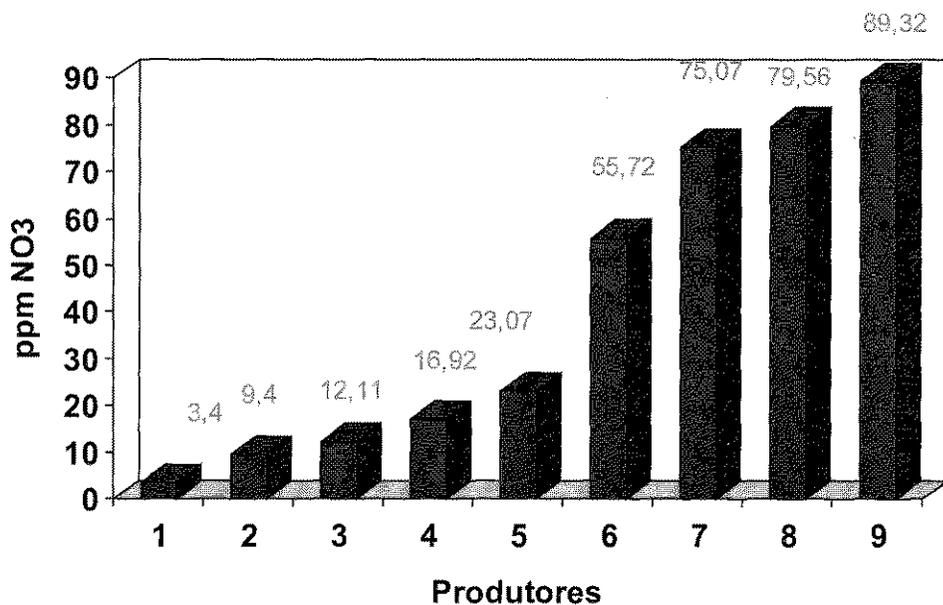


Figura 5 — Análise de variação do conteúdo de nitratos em lingüiça defumada — 2ª semana. Resultados representam a média de 3 amostras por produtor, numerados de 1 a 9. Valores dados em ppm NO<sub>3</sub>.

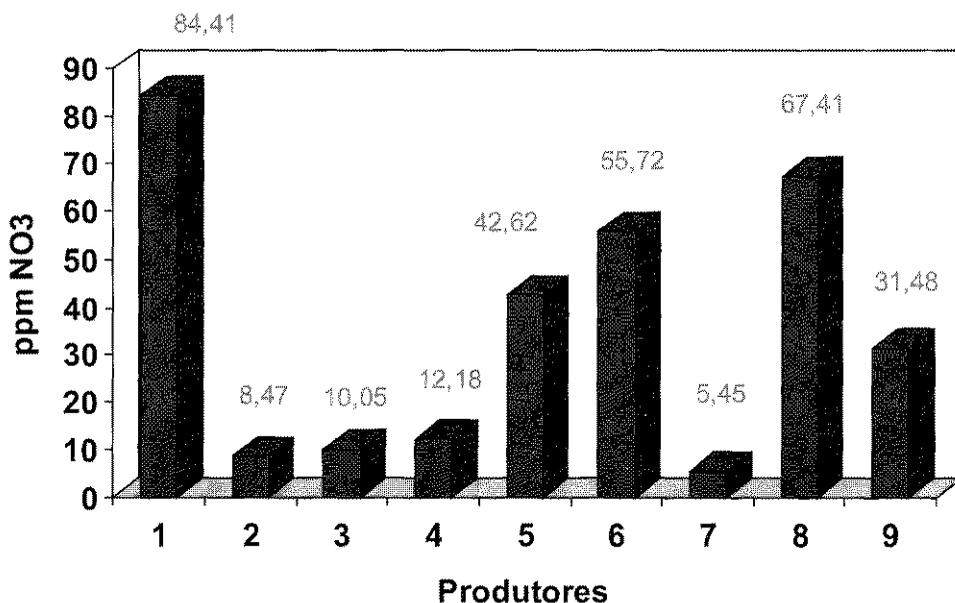


Figura 6 — Análise de variação do conteúdo de nitratos em lingüiça defumada — 3ª semana. Resultados representam a média de 3 amostras por produtor, numerados de 1 a 9. Valores dados em ppm NO<sub>3</sub>.

### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que os produtores não obedeceram a um padrão técnico pré-determinado. Possivelmente por esta razão, desconhecem a respectiva legislação referente à utilização destes compostos e consequentemente as prováveis implicações da manipulação sem critérios de nitratos e nitritos.

As sub-doses registradas através das médias semanais, não promovem proteção antibacteriana adequada. Como consequência o produto teve sua vida-de-prateleira reduzida (resultados não mostrados) dispersando a qualidade e, consequentemente, o valor de mercado.

Os valores encontrados estavam aquém do limite legal permitido, com valores muito heterogêneos durante as três semanas. Considera-se aconselhável que órgãos responsáveis pelo assessoramento de produtores rurais, realize programas de esclarecimento e treinamento permi-

tindo assim que os mesmos conheçam o critério técnico de manipulação dos nitratos e nitritos. Recomenda-se também um acompanhamento técnico permanente e a realização de coletas e análises periódicas por laboratório oficial.

Através dos resultados obtidos seria possível estabelecer um programa propondo a utilização somente de nitratos e de inibidores da reação de nitrosação, especialmente ascorbatos, diminuindo assim os riscos da formação de nitrosaminas, sem que com isso a qualidade final do produto fosse comprometida.

### AGRADECIMENTOS

O primeiro autor agradece ao Ministério da Agricultura, Laboratório de São José, Estado de Santa Catarina, pela inestimável ajuda durante a realização dos experimentos.

TURRA, M. & AYUB, M. A. Z. — Studies of the Content Variability of Nitrites and Nitrates in Cottage Sausage: Possible Public Health Implications. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2):1999.

**ABSTRACT:** Nitrites and nitrates are food additives used in large amounts in meat products since they contribute to the red colour fixation of cured meat, which is a highly desirable characteristic in sensory evaluation, and also because these components present bacteriostatic action. They possess, however, possible toxic effects to health, being their use and control the subject of world wide concern and research. In Brazil, there are many small producers of cottage sausage whose methods of production do not follow any technical guidance. In this work it was investigated the quantitative variation of nitrites and nitrates added to these products. Producers from the city of Blumenau, state of Santa Catarina, south of Brazil, were chosen to run this study because the region represents a traditional centre of these kind of small industries. Nine out of eighteen producers (n=50%) were randomly chosen among those registered by the Municipal Health Inspection Service. Calculations were based on a three week sampling program, with results representing the average value of every week. It was possible to identify a significant heterogeneity among producers and samples, showing a clear lack of technical criteria in the use of these additives. For both nitrites and nitrates observed amounts utilised were always well below of those recommended by Brazilian legislation, indicating possible risks to public health through bacteria contamination.

**Key words:** Nitrites; Nitrates; Food Additives; Public Health; Cottage Sausage producers.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANJOS, A. C. R. Nitrito em carnes curadas. *Rev. Nac. da Carne*, São Paulo, 227: 18-24, 1996.
2. ANJOS, A. C. R. Nitrito em carnes curadas: vantagens, desvantagens e recursos tecnológicos para reduzir os níveis de nitrosaminas no bacon. *Rev. Hig. Alimentar*, São Paulo, 29: 8 — 13, 1994.
3. BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Métodos Analíticos de Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. Diário Oficial*, Brasília, 25.07.1962.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 4 de 24 de Novembro de 1988, do Conselho Nacional de Saúde. (Aprova a revisão das tabelas I,III, IV e V e anexos I, II, III, IV e VII, todos do Decreto nº 55.871 de 26.03.65) — *Diário Oficial*, Brasília, 19.11.1988, Seção I, p. 24.716.
5. BUNIN, G. R., KUIJTEN, R. R., BOESEL, C. P., BUCKLEY, J. D., & MEADOWS, A. T.; Maternal diet and risk of astrocytic glioma in children: A report from the Childrens Cancer Group (US and Canada). *Cancer Causes Control*, 5:177-186, 1994.
6. CASSENS, R. G., Residual nitrite in cured meat. *Food Technol.*, 51(2):53-55, 1997.
7. CHAN, Y. Food-borne nitrates and nitrites in sausages is a cause of methemoglobinemia. *The Southeast Asian J. of Tropical Medicine and Public Health.*, Hong Kong, 1: 189 — 192, 1996.
8. DICH, J. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish mobile clinic health examination survey. *Food Additives and Contaminants*, Finland, 5: 541 — 552, 1996.
9. HOLLEY, R. A., Review of the potential hazard from botulism in cured meats. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 14:183-195, 1981.
10. NAZÁRIO, G. Aditivos: seu uso sob controle. *Rev. Nac. da Carne*, São Paulo, 224:34 — 38, 1995.
11. PETERS, J. M.; PRESTON-MARTINS, S., LONDON, S. J.; BOWMAN, J. D.; BUCKLEY, J. D.; & THOMAS, D. C., Processed meat and risk of childhood leukemia (California, US). *Cancer Causes Control*, 5:195-202, 1994.
12. RICKE, S. C.; & KEETON, J. T., *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, Washington, Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (ed.), 1997, p. 610-628.
13. ROBERTS, T. A., & GIBSON, A. M., Chemical methods for controlling *Clostridium botulinum* in processed meats. *Food Technol.*, 40:163-171, 1986.
14. SARASUA, S., & SAVITZ, D. A., Cured and broiled meat consumption in relation to childhood cancer (Denver, CO, US). *Cancer Causes Control*, 5:141-149, 1994.
15. SENZEL, A., & REYNOLDS, H. *Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 12Th ed., chap. 24, methods 24.034-24.038, p. 421-422, Washington, USA, 1975.

16. SOUZA, A. P., FALEIROS, A., SOUZA R. R. S.; & SOUZA, H. B. Dosagem de nitrito e nitrato em produtos embutidos de carne. *Alimentos e Nutrição*, São Paulo, 2:27 — 34, 1990.
17. TAVARES, M., ZANELATTO, A. M.; CARVALHO, J. B., BACETTI, L. B.; TAKAHASHI, Y. M., & AUED, S., Determinação de nitritos e nitratos em lingüiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 47(1/2):5 — 10, 1987.
18. TOMPKIN, R. B., *Antimicrobials in Food*, 2a ed., NY, Davidson, P. M., & Branen, A. L. (ed.), 1993, p. 191-262.
19. TORRES, Z. D., DÍAZ, C. M.; ROCHÉ, M. O.; JIMÉNEZ, E. A.; GONZÁLEZ, E. G.; & LOUIS, M. M., Nitratos y nitritos y su posible relación con la morbilidad por câncer de esôfago o estômago. *Rev. Cubana de Alimentacion y Nutricion*, 26:21-25, 1993.
20. TRUGO, L., & LASZLO H. Estudo comparativo de métodos de dosagem de nitrato em presença de nitrito em carnes. *Rev. Assoc. Bras. Ind. Alim.*, Rio de Janeiro, 46:24 — 35, 1980.

Recebido para publicação em 26/05/1999

## DETECÇÃO DE VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2 PELA TÉCNICA DE IMMUNOBLOTTING UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Maria Luisa BARBOSA<sup>1</sup>  
Júlia Maria M. SOUZA-FELIPPE<sup>1</sup>  
Benedito A. FONSECA<sup>2</sup>  
Peter N. MANSON<sup>3</sup>  
Ivani I. B. FERREIRA<sup>1</sup>  
José Antonio JEREZ<sup>4</sup>

RIALA 06/8774

BARBOSA, M. L. et al. — Detecção de vírus Dengue sorotipos 1 e 2 pela técnica de imunoblotting utilizando proteínas recombinantes. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 121-127, 1999

**RESUMO:** Os vírus dengue são patógenos que vêm afetando milhões de pessoas durante os dois últimos séculos. No presente trabalho, comparou-se a técnica tradicional de MAC-ELISA e o teste de *Immunoblotting*, utilizando-se proteínas recombinantes, para pesquisa de anticorpos da classe M, contra os vírus Dengue sorotipos 1 e 2. Foram testadas 100 amostras de soro de pacientes, com suspeita clínica de dengue, por MAC-ELISA e *Immunoblotting*. Estes soros quando submetidos ao MAC-ELISA resultaram 56 positivos para dengue e 44 negativos. Estas mesmas amostras avaliadas por *Immunoblotting* revelaram 56 soros negativos, 36 soros positivos para DEN-1, 6 para DEN-2 e 2 para DEN-1 e 2.

Proteínas recombinantes (DEN-1 e DEN-2) utilizadas como antígeno em *Immunoblotting* possibilitam um diagnóstico diferencial dos sorotipos de dengue circulantes em determinada área, enquanto o teste de MAC-ELISA apesar de sensível e rápido não tipifica o sorotipo de dengue, dado importante durante os períodos de epidemias.

**DESCRITORES:** Dengue, MAC-ELISA, *Immunoblotting*, proteínas recombinantes

### 1. INTRODUÇÃO

Os vírus Dengue vêm infectando milhões de pessoas durante os dois últimos séculos. A história natural da doença está ligada ao meio ambiente e a hábitos domésticos da população. São transmitidos principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, porém outros *Aedes* spp, encontrados nos trópicos, são vetores potenciais e

mais da metade da população humana está exposta à picada destes artrópodos. Na maioria dos casos de infecção, ocorre a febre do dengue clássico ou a febre indiferenciada, porém a febre hemorrágica do dengue pode acontecer evoluindo para choque (síndrome de choque), ocasionando morte do paciente<sup>9,11</sup>.

Os vírus Dengue são arbovírus que pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Até o momento

1 Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Luz, Laboratório Central

2 Professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

3 Yale University School of Medicine, Yale Arbovirus Research Unit, Department of Epidemiology and Public Health, New Haven, CT, USA

4 Professor da Faculdade de Medicina Veterinária, USP

são conhecidos quatro sorotipos distintos do vírus Dengue: sorotipo 1 (DEN-1), sorotipo 2 (DEN-2), sorotipo 3 (DEN-3) e sorotipo 4 (DEN-4). A exemplo de outros flavivírus apresentam envelope, nucleocapsídeo e genoma formado por um RNA de fita simples, senso positivo e aproximadamente 11 kb<sup>4,21,29,30</sup>. Um aspecto importante do genoma destes vírus é a presença de uma estrutura conhecida como *Open Reading Frame* (ORF). Este ORF é responsável pela codificação de uma poliproteína, a qual é processada em 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais<sup>4</sup>. Entre as três proteínas estruturais (core [C], membrana [M] e envelope [E]) a proteína E tem um papel importante na biologia do vírus uma vez que é responsável por varias atividades biológicas incluindo montagem do vírus (maturação), fusão celular e imunogenicidade induzindo anticorpos neutralizantes e de anticorpos inibidores da hemaglutinação<sup>13,26</sup>.

O mapa topológico da proteína E revelou vários domínios antigênicos, entretanto três (domínio I, II e III) foram definidos como principais, sendo cada um composto de vários epítomos que exibem diferentes atividades funcionais e sorológicas<sup>13,14,17,19,22,23</sup>.

O domínio II da proteína E contém um fragmento de aproximadamente 100 aminoácidos, com vários resíduos de cisteína, os quais são importantes na preservação da ponte dissulfídica N-terminal, responsável pela estrutura conformacional dos sítios antigênicos. A partir dessa seqüência de aminoácidos foram produzidas proteínas recombinantes dos vírus da encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus - JEV) e DEN-1 que podem ser empregadas como antígenos em reações sorológicas<sup>18,19</sup>.

Proteínas E recombinantes para a região do domínio II dos sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 foram produzidas e testadas em suas reatividades com fluido ascítico de camundongos imunizados, utilizando-se os ensaios imunoenzimáticos tipo ELISA<sup>8</sup>.

No presente trabalho, a partir de soros de pacientes com suspeita clínica de dengue, estudou-se a resposta imune humoral de anticorpos da classe M pela técnica tradicional de MAC-ELISA e comparou-se os resultados com o teste de *immunoblotting* realizado com proteínas E recombinantes dos sorotipos DEN-1 e DEN-2.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de Soro

Amostras de soro foram obtidas de 100 pacientes, após 5 dias ou mais do início dos sintomas da doença. Os soros eram de pacientes procedentes de diferentes regiões geográficas do Brasil: São Paulo, Alagoas e Mato Grosso do Sul e foram enviadas para a Seção de Vírus

Transmitidos por Artrópodos para diagnóstico sorológico de infecção pelo vírus Dengue. Amostras do Estado de São Paulo foram enviadas por Centros de Saúde, Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz e Serviços de Vigilância Epidemiológica. Os soros procedentes de Alagoas e Mato Grosso do Sul foram enviados pelo Laboratório Central de Saúde (LACEN) de cada Estado. As amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante e os soros foram separados por centrifugação (10 min. a 2000 rpm), acondicionados em frascos, identificados e armazenados a -20 °C. As amostras, de Alagoas e Mato Grosso do Sul, foram enviadas, após separação dos soros, em caixas de isopor com gelo comum ou gelo seco e também mantidas a -20°C até serem analisadas pelas técnicas propostas neste estudo.

### 2.2. Antígenos

Os antígenos foram preparados pela Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos (Instituto Adolfo Lutz), a partir de cérebro de camundongos albinos *swiss*, de dois ou três dias de idade, por extração com sacarose - acetona e titulação por hemaglutinação, com hemácias de ganso<sup>7</sup>. A diluição que corresponde a 16 unidades hemaglutinantes foi utilizada para a realização da técnica de MAC-ELISA.

### 2.3. Proteínas E recombinantes

*E. coli* transformadas, contendo parte do genoma da proteína E, inserido em plasmídeo pATH 3DNA, foram gentilmente cedidas pelos Drs. Benedito A.L.Fonseca e Peter Mason (Yale University School of Medicine, Yale Arbovirus Research Unit, department of Epidemiology and Public Health, New Haven, CT, USA). Os recombinantes utilizados foram D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. A diferença entre E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> esta na presença do aminoácido cisteína em E<sub>1</sub>, responsável pela formação da ponte dissulfídica do segmento II da proteína E.

As bactérias *E. coli* transformadas foram crescidas em meio M<sub>9</sub> formulado segundo Sambrook et al<sup>24</sup>, na presença ou ausência de triptofano, para produção das proteínas recombinantes. Após tratamento com lisozima e NaCl a 5M foi obtido um sedimento amarelado contendo as proteínas recombinantes que foram ressuspensas em 1 mL de tampão TRIS/SBU (10mM TRIS, 1% SDS (*Sodium Dodecil Sulphate*), 1% β -mercaptoethanol, 6M úrea, pH 7,2) (MASON et al 1989) e então estocadas a -20°C até o uso.

### 2.4. MAC-ELISA

O MAC-ELISA foi realizado, segundo a técnica desenvolvida por KUNO et al<sup>15</sup>. A sensibilização das

microplacas (Corning, NY, USA) foi feita utilizando-se 100 µl, por orifício, de anti-IgM humano (Sigma, Chemical, St Louis, USA), específico para a cadeia, produzido em cabra, diluído a 1:240 em solução tampão carbonato 0.1M pH 9,6. As microplacas foram incubadas a 4°C em câmara úmida por 18 horas e então lavadas 5 vezes com *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,4. Uma etapa de bloqueio foi efetuada com 150 µl por orifício de PBS, contendo albumina bovina, (Sigma, Chemical, St Louis, USA), a 4%, e incubação de 30 min a temperatura ambiente. Após este período foram lavadas novamente 5 vezes com PBS e usadas imediatamente ou estocadas a -20°C até o uso.

Após lavagem, de 5 vezes com PBS, foram adicionados, por orifício, 50 µl de cada soro em teste em uma diluição de 1/40 em PBS com 0,5% de albumina bovina. A seguir as microplacas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em cada placa foram testadas 43 amostras de soro em duplicata, controles positivo e negativo. Outra etapa de 5 lavagens com PBS e 50 µl de um *pool* de antígenos DEN-1 e DEN-2, com 16 unidades hemaglutinantes de cada antígeno, diluído em PBS com 20% de soro de cavalo normal, foi adicionada em cada orifício. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Após incubação e lavagens o anticorpo monoclonal, anti-flavivírus, preparado em camundongos, marcado com peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories), utilizado na diluição de 1/2500 em PBS com 20% de soro de cavalo normal, foi adicionado (25µl em cada orifício) e as placas foram incubadas por 1h a 37°C em câmara úmida. As microplacas foram lavadas 7 vezes com PBS e seguiu-se a adição de 100µl de substrato ABTS (2,2-azino-di-(3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid) diammonium salt – marca Kirkegaard & Perry Laboratirie), composto por duas soluções: Sol. A = ABTS e Sol. B = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preparada em partes iguais, no momento de uso. Após incubação à 37°C/30 minutos a leitura foi realizada em leitor de ELISA Titertek Multiscan MCC a 414 nm. Não foi necessário interromper a reação para leitura.

As amostras de soro foram testadas em duplicata. O primeiro orifício denominado TESTE continha todas as etapas do MAC-ELISA tradicional como descrito acima, o segundo orifício denominado controle não continha o antígeno, apenas o diluente do mesmo. Este tipo de controle foi importante na redução de falsos positivos. Resultado positivo nos dois orifícios são considerados inespecífico. Soros positivos foram aqueles com leitura de densidade óptica (DO) maior que 0.200.

### 2.5. *immunoblotting*

O método usado foi o descrito por TOWBIN et al<sup>27</sup> e BURNETTE<sup>3</sup> com algumas modificações. O extrato de

proteína E recombinante obtido foi submetido à separação em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) e transferido para membranas de nitrocelulose<sup>22</sup>. As membranas foram cortadas em tiras contendo os quatro tipos de antígenos: D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Procedeu-se inicialmente o bloqueados com BSA 3%, durante 18 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente cada tira foi lavada três vezes em PBS pH 7,4 e a seguir foi adicionado o soro do paciente diluído 1:40 em BSA 1% por 2h a temperatura ambiente e constante agitação. Decorrido este período de tempo foram feitas 3 lavagens, de 10 minutos cada, em BSA 1%. As membranas foram incubadas com conjugado anti-gamaglobulina humano (IgM), produzido em cabra, ligado à peroxidase (Sigma, Chemical, St Louis, USA) e diluído 1:800 em BSA 1%. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 horas e constante agitação. As tiras foram lavadas como acima e coradas com solução de 0,5 mg/mL de 3.3.diaminobenzidina (DAB — Sigma, Chemical, St Louis, USA) com 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS.

A sensibilidade, especificidade e eficiência, para IgM, foram calculados segundo a tabela 1 e formulas apresentadas a seguir.

Tabela 1. Formulas para os cálculos da sensibilidade, especificidade e eficiência,

MAC-ELISA Immunobl.	positivo	negativo	Total
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

#### 1) Sensibilidade

$$S = \frac{A}{a+c} \times 100$$

#### 2) Especificidade

$$E = \frac{D}{b+d} \times 100$$

#### 3) Eficiência

$$Ef = \frac{a+d}{A+b+c+d} \times 100$$

### 3. RESULTADOS

Os soros de pacientes com suspeita clínica de dengue testados por MAC-ELISA resultaram em 56 positivos para dengue e 44 negativos. Estas mesmas amostras quando avaliadas por *immunoblotting* apresentando diferentes antígenos para a detecção de DEN-1 e DEN-2, revelaram 56 soros negativos, 36 positivos para DEN-1, 6 para DEN-2 e 2 produziram reação visível para DEN-1 e DEN-2. Entre os soros positivos pelas duas técnicas (n=40) verificou-se que 33 eram DEN-1 positivo, 5 DEN-2 positivos e 2 DEN-1 e DEN-2 positivos pela técnica de *immunoblotting*; 16 amostras foram positivas só em MAC-ELISA, não sendo possível determinar qual o sorotipo, quatro foram positivas apenas em *immunoblotting*, sendo 3 DEN-1 e 1 DEN-2 e 40 negativos para as duas provas (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado comparativo dos testes de MAC-ELISA e *immunoblotting* em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue, colhidas de pacientes a partir do 5º dia pós manifestações clínicas. São Paulo, 1995.

MAC-ELISA \ Immunoblotting	MAC-ELISA		Total
	Positivos	Negativos	
DEN-1	33	3	36
DEN-2	5	1	6
DEN-1 e DEN-2	2	-	2
Negativos	16	40	56
Total	56	44	100

Tomando os resultados de MAC-ELISA como padrão, a sensibilidade do *immunoblotting* com antígenos recombinantes para D1E1 e D2E1 foi de 71%, enquanto a especificidade e eficiência foram de 90% e 80% respectivamente.

### 4. DISCUSSÃO

*Immunoblotting* é uma técnica relativamente rápida e sensível de caracterização de antígenos proteicos pois combina a separação de proteínas de diferentes pesos moleculares por eletroforese, com a identificação imunológica dessas proteínas<sup>2</sup>, sendo portanto uma técnica valiosa para propósitos experimentais e informações

moleculares<sup>5,16</sup>. A técnica de *immunoblotting* no diagnóstico de dengue pode identificar o sorotipo específico circulante em determinada região. CHURDBOONCHART et al<sup>5</sup> usaram esta combinação para detectar imunoglobulinas M e G produzidas contra o vírus dengue, em soro de pacientes com Febre Hemorrágica e Síndrome do Choque, confirmando o diagnóstico sorológico; uma vez que MAC-ELISA, como único teste diagnóstico de rotina, para a detecção de IgM contra o vírus dengue, pode resultar em possíveis reações cruzadas intraespecífica e interespecífica, levando a resultados falsos positivos.

Várias evidências sugerem que muitos dos epítopos neutralizantes em flavivírus estão na glicoproteína E. O domínio II (aminoácidos 300 a 400) parece fazer parte dos sítios de ligação de receptores dos flavivírus<sup>12</sup>. Analisamos os antígenos recombinantes de DEN-1 e 2, desta região, a fim de explorar as possibilidades de um diagnóstico diferencial destes dois sorotipos de dengue. Os soros dos pacientes, utilizados nas análises, foram obtidos de três diferentes regiões brasileiras: Estado de São Paulo, Estado de Alagoas e Estado de Mato Grosso do Sul, onde estes vírus são epidêmicos. Em infecções primárias por vírus Dengue, altos títulos de IgM podem ser detectados por MAC-ELISA; todavia, IgM para os polipeptídeos dos vírus DEN são ainda pouco detectáveis em *immunoblotting*. Partindo da estrutura integral do vírus, CHURDBOONCHART et al<sup>5</sup> analisaram, por *immunoblotting*, soros de pacientes após infecção primária com dengue e mostraram que IgM para este vírus foram raramente e inconsistentemente detectados por SDS-PAGE/ *immunoblotting*. Nossas observações estão de acordo com estes dados, pois do total de positivos para MAC-ELISA (56) apenas 78,5% (44 de 56) foram positivos para IgM quando testados por *immunoblotting*.

Entre os casos de dengue negativos por MAC-ELISA quatro (7%) foram positivos para IgM em *immunoblotting*. Este resultado pode ser devido a falsos negativos, dentro dos 10% esperados em MAC-ELISA, segundo dados da PAHO<sup>20</sup>. Já 16 casos foram MAC-ELISA positivos e “*immunoblotting*” negativos para IgM. Estes achados podem ser decorrentes de uma possível perda de reconhecimento do antígeno-anticorpo. A maioria dos epítopos das proteínas E e NS1 dos vírus MVE e TBE são sensíveis a agentes redutores<sup>19,15</sup>, efeito também observado sobre algumas proteínas de vírus dengue, após tratamento com 2 β-mercaptoetanol, utilizado como agente redutor<sup>6</sup>.

Estes resultados podem ainda ser decorrentes de título da imunoglobulina M insuficiente para uma resposta positiva assim como da perda de intensidade de ligação da proteína E em *immunoblotting*, por prováveis alterações conformacionais dos epítopos D1E1/D1E2 e D2E1/D2E2, tornando menos acessíveis para os anticor-

pos IgM. É importante também salientar a competição entre as imunoglobulinas IgG e IgM na técnica de *immunoblotting*, o que fica reduzido no MAC-ELISA por se tratar de um método de Captura.

Ressaltamos que até o momento não foram isolados casos positivos autóctones para os sorotipos 3 e 4, nos Estados de origem das amostras de sangue analisadas. Sendo assim, futuras investigações da presença de anticorpos, para estes sorotipos do vírus da dengue, serão necessárias naquelas 16 amostras positivas só no MAC-ELISA, antes de descartarmos a possibilidade de falsos positivos e/ou a ocorrência real de alterações nos epitopos dos sorotipos estudados neste trabalho.

Estudos realizados com outros vírus descrevem que *immunoblotting* é mais eficiente que ELISA para detec-

ção de anticorpos específicos tanto para o vírus da Peste Suína Africana<sup>1</sup> como para o reovírus sorotipo 3<sup>25</sup>. Entretanto, o uso de *immunoblotting* no diagnóstico laboratorial tem consistido apenas na confirmação dos casos positivos em ELISA. Nos casos da Peste Suína Africana muitos laboratórios de diagnóstico tem substituído a imunofluorescência por *immunoblotting*<sup>1</sup>.

Apesar de MAC-ELISA ser um método sensível e rápido, no diagnóstico de dengue, não tipifica os sorotipos de dengue circulantes e ainda podem ocorrer reações cruzadas entre os diferentes flavivírus. Nossos estudos mostraram que os ensaios de *immunoblotting*, com proteínas recombinantes (DEN-1 e DEN-2), são qualitativas e importantes na definição do sorotipo circulante, pois resultam em respostas rápidas durante períodos epidêmicos.

RIALA 06/874

BARBOSA, M.L. et al. — Detection of dengue virus serotypes 1 and 2 by immunoblotting techniques using recombinant proteins. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 121-127, 1999.

ABSTRACT: Dengue viruses (DEN-1 to 4) are human pathogens affecting millions of people in the last two centuries. Results of a comparative study between the traditional MAC-ELISA method and the Immunoblotting techniques using recombinant proteins of DEN-1 and DEN-2 to detect virus specific class M Immunoglobulins, are reported in this paper. One hundred sera samples were studied. Fifty six samples were positive to dengue by MAC-ELISA and 44 were positive by Immunoblotting technique: 36 to DEN-1, 6 to DEN-2 and 2 to DEN-1 and 2 sorotypes. So, the serotype identification of the dengue virus circulant in a determined area is possible by using these recombinant proteins in Immunoblotting techniques. These data are important for epidemiological surveillance mainly during the occurrence of an epidemic

Keyword: Dengue, MAC-ELISA, Immunoblotting, recombinants proteins

## REFERÊNCIAS

1. ALCARAZ, C.; RODRIGUEZ, F.; OVIEDO, J.M.; EIRAS, A.; De DIEGO, M.; ALONSO, C. & ESCRIBANO, J.M.. Highly specific confirmatory Western blot test for African Swine Fever virus detection using the recombinant protein p54. *J. Virol. Methods*, 53: 111-119, 1995.
2. AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G. & STRURHL, R.E. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons, 1989.
3. BURNETTE, W.N.. "Western blotting": eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiated protein A. *Anal. Biochem.*, 112: 195-203, 1981.
4. CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M., Flavivirus genome organization expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44: 649- 688, 1990.
5. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. & SIRINAVIN, S.. Antibodies Against Dengue viral proteins in primary and Secondary Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 481-493, 1991.
6. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. PINTHONG, C.; SIRINAVIN, S. & CHAIYOTHA, A.. Antibodies

- to dengue viral polypeptides. I. Sensitivity and specificity of the viral-antigen-strips/ enzyme immunoassay. *South. Asian J. Trop. Med. Public Health*, 18: 362-372, 1987.
7. CLARKE, D.H. & CASALS, J.. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 7: 551, 1958.
  8. FONSECA B.A.L., KHOSHNOOD K., SHOPE R.E. & MANSON P.W.. Flavivirus Type- Specific Antigens Produced from Fusions of a Portion of the E Protein Gene with the Escherichia coli TrpE Gene. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 500-508, 1991.
  9. GUBLER, D.J.. Dengue/Dengue Hemorrhagic fever in the Americas: Prospects for the year 2000. pg-19-27. In: *Dengue: A Worldwide Problem, a Common Strategy*. Ed. by S.B. Halstead & Gomez-Dantes, 1992.
  10. HALL, R.A.; KAY, H.B.; BURGESS, G.W.; CLANCY, P. & FINNING, I.D.. Epitope analysis of the envelope and non-structural glycoproteins of Murray Valley encephalitis virus. *J. Gen. Virol.*, 71:2923-2930, 1990.
  11. HALSTEAD, S.B.. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology- *Science*, 239: 476- 481, 1988
  12. HASEGAWA, W.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S. & KOBAYASHI, Y.. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology*, 191: 158-165, 1992.
  13. HEINZ, F.X.. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Virus Res.*, 31: 103-168, 1986.
  14. HENCHAL, E.A.; McCOWN, J.M.; BURKE, D.S.; SEGUIN, M.C. & BRANDT, W.E.. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 162-167, 1985.
  15. KUNO, G.; GÓMEZ, I. & GUBLER, D.J.. Detecting artificial anti-dengue IgM Immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Trop. Med. Hyg.*, 36: 153-159, 1987.
  16. LINDO, J.F.; CONWAY, D.J.; ATKINS, N.S.; BIANCO, A.E.; ROBINSON, R.D. & BUNDY, D.A.P.. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Trongyloides stercoralis* infection. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 51: 175-179, 1994.
  17. MANDL, C.W.; HEINZ, F.X.; STÖCKL, E. & KUNZ, C.. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus ( Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other Flaviviruses. *Virology*, 173: 291-301, 1989.
  18. MASON, P.W.; DALRYMPLE, J.M.; GENTRY, M.K.; McCOWN, J.M.; HOKE, C.H.; BURKE, D.S.; FOURNIER, M.J. & MASON, T.L.. Molecular Characterization of the Japanese Encephalitis Virus Structural Glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 70: 2037- 2049, 1989.
  19. MASON, P.W.; ZUGEL, M.U.; SEMPRONI, A.R.; FOURNIER, M.J. & MASON, T.L.. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in Escherichia coli. *J. Gen. Virol.*, 71: 2107-2114, 1990.
  20. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washington, D.C.: PAHO, 1994.
  21. RICE, C.M.; STRAUSS, E.G. & STRAUSS, J.H.. Structure of the flavivirus genome. In: S. Schlesinger & M.J. Schlesinger. *Togaviridae and Flaviviridae*, New York: Plenum, 1986, 279-326.
  22. ROEHRIG, J.T.; JOHNSON, A.J.; HUNT, A.R.; BOLIN, R.A. & CHU, M.C.. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology*, 177: 668-675, 1990.
  23. ROEHRIG, J.T.; MATHEWS, J.H. & TRENT, D.W.. Identification of epitopes on the E glycoprotein of St. Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Virology*, 128: 118, 1983.
  24. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
  25. SELB, B. & WEBER, B.. A study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and Western blot. *J. Virol. Methods*, 47: 15-26, 1994.
  26. SMITH, G.W. & WHIGHT, P.J.. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and Aedes albopictus cells. *J. Gen. Virol.*, 66: 559-571, 1985.
  27. TOWBIN, H.; STAHELIN, T. & GORDON, J.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354, 1979.
  28. VOLLER, A. & BIDWELL, D.. Enzyme-linked immunosorbent assay. In Rose, N.R./Fridman, H & Fahey, J.H. eds. *Manual of Clinical Laboratory*

- Immunology*. Washington, DC American Society for Microbiology. 99-109, 1986
29. WESTAWAY, E.G. Flavivirus replication strategy. *Adv. Virus Res.*, 33: 45-90 1987.
30. WESTAWAY, E.G. Replication of Flavivirus In: *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press, 1980, 531- 581.

Recebido para publicação em 10/06/1999

Impresso em off set



Rua Clark, 136 - Moóca  
03167-070 - São Paulo - SP  
Fones: (0XX) 0692-7344  
6692-2226 / 6692-8749

com tintas fornecidas pelo editor