



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN0073-9855

RIALA6

VOLUME 45

NUMERO 1/2

JUN./DEZ., 1985



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

WALDOMIRO PREGNOLATTO
Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA, *Presidente*
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO
LUIS FLORENCIO DE SALLES GOMES
MYRNA SABINO
NEUS PASCUET PREGNOLATTO
ODAIR ZENEBO
PEDRO PAULO CHIEFFI
ROBERTO A. PINTO PAES
SARA TETNER BURSTEIN, *Secretário*

REDATOR-SECRETÁRIO

DÉBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

Endereço/address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 — Caixa Postal 7027
01000 — São Paulo, SP — Brasil
Endereço telegráfico: IALUTZ

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

(*)

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

1941-1984, 1-44
1985 45(1/2)

ISSN 0073 — 9855
RIALA6

CDD 18 614.07205



(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas.* São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, Tropical Diseases Bulletin and Virology Abstracts.

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 45(1/2):1-99, jun./dez. 1985.

SUMÁRIO/CONTENTS

- 589 Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cálamu em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*
Toxicity of α and β -asarone, and calamus oil for mice, chick embryos, and mutagenicity for Salmonella typhimurium
Helena Yuco YABIKU; Seizi OGA; Franco LAJOLO & Heloisa ANDRIGUETTI 1-12
- 590 Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca
A comparison of methods for detection of filth in surplus-bread flour
Claydes de Quadros ZAMBONI & Regina Maria Morelli Silva RODRIGUES 13-20
- 591 Cascas de semente de cacau em chocolate em pó
Presence of cocoa-seed shells in powdered chocolate
Claydes de Quadros ZAMBONI; Helena Ide ALVES & Nazareth SPITERI 21-25
- 592 Partículas metálicas em farinha de trigo
Metal particles in wheat flour
Claydes de Quadros ZAMBONI; Helena Ide ALVES; Nazareth SPITERI & Regina Maria Morelli Silva RODRIGUES 27-29
- 593 Prevalência dos marcadores sorológicos da hepatite B em soros de banco de sangue na cidade de São Paulo
Prevalence of serological markers of hepatitis B in blood-bank donors from the city of São Paulo
Sandra Maria da ROCHA; Regina Tomie KIMURA; Carlos TATUTA; Augusta Kiyomi TAKEDA; Araripe Pacheco DUTRA; Edson Augusto de Sousa e SILVA; Waldemar EBNER FILHO & William Carlos ISHIY 31-36
- 594 Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença
Passive hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis in some stages of illness
Maricy Alves RIBEIRO; Zélia Maria de Oliveira CAVALCANTE; Delza Márcia LOPES; Raquel Bellinati Robert PIRES; Márcia de Souza Carvalho MELHEM; Antonella GODANO; Massami KAWARA-BAYASHI & Thais Helena Sampaio VIANNA 37-42

595	Varição dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981 <i>Levels of organochlorine pesticide residues in pasteurized milk sold in São Paulo City between 1980 and 1981</i> Walkyria H. LARA; Heloisa H.C. BARRETO & Odete N.K. INOMATA	43-52
596	Frequência de anticorpos para os vírus da influenza tipos A e B, em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, em 1982 <i>Frequency of antibodies against type A and B influenza virus in inhabitants of São Paulo City, in 1982</i> Maria Akiko ISHIDA; Shunji SAKAKIBARA; Yoko YOKOTA & Asao YAMAGUCHI	53-59
597	Verificação das condições higiênicas de biscoitos por microscopia <i>Filth contamination of commercial biscuits sold in São Paulo City</i> Claydes de Quadros ZAMBONI & Mônica Arcon BATISTIC	61-64
598	Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por <i>Escherichia coli</i> , na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens <i>Effect of the inoculation of Escherichia coli endotoxin on the thymus histology and weight of young mice</i> Marcos Kenzo FUNATSU; Rodrigo Brito ERLICH; Marcos Luís MONTAGNINI; Carlos Alberto FERRANDEZ; Cesar Augusto OGAWA & Roberto A. Pinto PAES	65-72
599	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> isolada de sangue <i>Isolation of Corynebacterium diphtheriae from human blood</i> Cláudio Tavares SACCHI; Maria Lúcia Cecconi TONDELLA; Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE; Carmo Elias Andrade MELLES & Marinella Della Negra de PAULA	73-79
600	Identificação simultânea dos ácidos benzóico, cítrico e láctico em refrigerantes, por cromatografia em camada delgada <i>Simultaneous identification of benzoic acid, citric acid, and lactic acid in commercial soft drinks, by thin-layer chromatography</i> Almir José RICCIARDI; Jacob Fernando FERREIRA & Nina Turko CARLUCCI	81-84
601	Métodos para controle físico e biológico de catagutes simples. Observação sobre o efeito do glixal <i>Methods for physical and chemical control of simple catgut samples. Observations on the effect of glixal</i> Walter ALVES; Otilia F. NOVO & Ileana E.M. FONSECA	85-87
602	Sujidades em farinhas de trigo, mandioca, milho, e em fubá de milho <i>Filth in wheat flour, cassava flour, corn flour and corn meal</i> Claydes de Quadros ZAMBONI; Regina M.M. Silva RODRIGUES; Mônica Arcon BATISTIC; Helena Ide ALVES; Nazareth SPITERI & Márcia Bittar ATUI	89-93
INDICE DE AUTOR		95
INDICE DE ASSUNTO		97
SUBJECT INDEX		99

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

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

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

Página de rosto

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

Texto

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

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

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

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

UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS — Deverão ser usadas somente as unidades legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução n.º 01/82 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Diário Oficial*, Brasília, 10 maio 1982. Seção I, pt. I, p. 8384-93. Aprova a regulamentação metrológica das unidades de medida).

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

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

—	quando, pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;	
Z	quando o dado for rigorosamente zero;	
...	quando não se dispuser do dado;	
0 0,0 0,00	} quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.;	
X		quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Para artigos de periódicos

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico abreviado (*World list of scientific periodicals*, 4th ed. London, Butterworths, 963-65. 3 v.), em grifo, n.º do volume, n.º do fascículo (quando a numeração não for continuada), páginas inicial e final do artigo, data da publicação do volume ou fascículo.

Ex.:

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

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra (em grifo), n.º da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, n.º de páginas, ou volumes (ou n.º da página consultada).

Ex.:

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor alterações do original. Este original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de recebimento, salvo o caso especial de *nota prévia*, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, na conformidade da legislação sobre Direitos Autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

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

EFEITOS TÓXICOS DE α E β -ASARONAS E DO ÓLEO DE CÁLAMO EM CAMUNDONGOS, EMBRIÕES DE GALINHA E MUTAGENICIDADE EM *SALMONELLA TYPHIMURIUM* *

Helena Yuco YABIKU **
Seizi OGA ***
Franco LAJOLO ****
Heloisa ANDRIGHETTI ****

RIALAG/589

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cálamo em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 45(1/2): 1-12, 1985.

RESUMO: Foram verificadas as DL50 do óleo de cálamo de variedades diferentes, assim como os seus componentes ativos α e β -asaronas em camundongos, por via intraperitoneal. A DL50 do óleo de cálamo, variedade indiana, foi de 154,5 mg/kg, a da β -asaronas, de 184,0 mg/kg e a da α -asaronas, de 226,0 mg/kg. Para variedade européia e para o extrato oleoso isento de asaronas, em virtude de suas baixas toxicidades agudas, não foi possível a determinação dos valores de DL50.

O estudo da toxicidade em embriões de galinha para verificar eventual atividade teratogênica foi feito também para os óleos de diferentes variedades, assim como os componentes α e β -asaronas isolados. A mortalidade média variou de 10,0 a 100,0% e não se constataram sinais de malformação nos embriões desenvolvidos.

O teste de Ames foi conduzido com o componente β -asaronas nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 μ g/placa. A amostra não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das concentrações, frente à cepa de *Salmonella typhimurium*, com e sem adição de ativador obtido de extrato de fígado de rato após indução com Aroclor 1254.

DESCRITORES: α e β -asaronas, efeitos tóxicos em camundongos e em embriões de galinha; α e β -asaronas, atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium*; óleo de cálamo, efeitos tóxicos em camundongos e em embriões de galinha; óleo de cálamo, atividade mutagênica em *S. typhimurium*.

INTRODUÇÃO

O *Acorus calamus*, conhecido no Brasil como cálamo, é uma planta encontrada em zonas temperadas e, segundo CAVAZZA², ela pode ser classificada em 4 citotipos correspondentes às variedades norte-americana (diplóide), européia (triplóide), indiana Jammu (tetraplóide) e Kashmir (hexaplóide).

Desde a antigüidade, as raízes e os rizomas do cálamo têm sido usados para o tratamento de várias doenças, sendo bastante conhecidos os seus usos como espasmolítico, normotensor e também como inseticida⁶.

As propriedades biológicas do cálamo, variedade tetraplóide, são atribuídas à presença da β -asaronas (isômero cis) que chega a constituir, nas variedades indianas, cerca de 80%

* Realizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

*** Do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**** Do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

do óleo. A α -asaronas ou isômero *trans* está presente em quantidades menores, cerca de 1% apenas⁶.

Na literatura, verifica-se a existência de muitos dados sobre a DL50 do óleo de cáalamo da variedade indiana, mas há poucas informações sobre a variedade européia. A DL50 do óleo de cáalamo, variedade européia, por via intraperitoneal, em ratos, foi relatado recentemente por YABIKU et alii¹⁰. Por outro lado, os valores de DL50 da α -asaronas isolada, que aparecem na literatura, são conflitantes; no INDEX MERCK¹¹, é citada como dose letal 50% para α -asaronas, administrada intraperitonealmente em cobaias, o valor de 275 mg/kg, enquanto não se verifica nenhum dado de DL50 para β -asaronas. Esses valores, porém, foram obtidos para o óleo e não para α -asaronas, nos estudos toxicológicos realizados por CHOPRA et alii³, a que o Index Merck se refere.

SHARMA & DANDIYA¹⁴ foram os únicos a informar os valores de DL50 para α e β -asaronas isoladas, que variaram de 300 a 122 mg/kg, respectivamente, em ratos, por administração intraperitoneal.

Diante da constatação do aparecimento de tumores malignos no intestino delgado e outras alterações em ratos tratados com o óleo indiano, adicionado na ração em concentrações de 500, 1.000, 2.500 e 5.000 ppm, o uso de cáalamo foi completamente banido nos Estados Unidos¹⁶. Em estudos realizados por Habermann (informação pessoal), essa carcinogenicidade do óleo de cáalamo foi atribuída à presença de β -asaronas, a qual, segundo esse autor, seria capaz de provocar o aparecimento de tumores malignos no intestino delgado dos ratos⁹.

Graças às suas propriedades organolépticas, o óleo de cáalamo é atualmente usado em larga escala nas indústrias de bebidas e perfumarias, e níveis de até 30 ppm desse óleo podem ser encontrados em *bitters*, licores e vermutes¹⁸.

O controle de óleo de cáalamo, mais especificamente da β -asaronas, foi feito por nós em 56 amostras de bebidas alcoólicas, do tipo amargo, consumidas no Brasil, verificando-se que apenas uma delas tinha teores acima do permitido, que é de 1 ppm, estabelecido pelo Conselho da Europa⁴.

Dando continuidade a estudos anteriores, um dos objetivos do trabalho foi o de determinar a DL50 de óleos de cáalamo das variedades indiana e européia, paralelamente com a de seus principais componentes isolados, α e β -asaronas, para sanar dúvidas com relação às suas toxicidades. Também foi estudada a toxicidade do extrato oleoso isento de asaronas.

Em complementação aos estudos realizados por diversos autores determinaram-se, ainda neste trabalho, a toxicidade em embriões de galinha, dos óleos e seus componentes, para verificar sua eventual atividade teratogênica.

Esses ensaios foram planejados em função de resultados conflitantes encontrados na literatura. Além disso, foram feitos ensaios com teste de Ames para detecção eventual da atividade mutagênica desses compostos.

Segundo GOGGELMANN & SCHIMMER⁸, a β -asaronas é mutagênica pelo teste de Ames, enquanto que HSIA et alii¹⁰ relataram pelo mesmo teste a não existência de atividade mutagênica, mesmo em concentrações de 2 a 200 μ g/placa, estando o assunto a merecer um esclarecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os padrões de óleo de cáalamo, variedade européia, foram fornecidos pela "Firmenich & Cia. Ltda." e o de variedade indiana pelo "Food and Drug Administration", dos EUA. Os componentes isolados α e β -asaronas foram adquiridos, respectivamente, da "Sigma Chemical Co." e da "Fritzsche Dodge & Olcott Inc."

Preparo do extrato oleoso isento de α e β -asaronas

Preparou-se uma coluna cromatográfica de 2x15 cm de alumina. Inicialmente a coluna foi umedecida com éter de petróleo (30 a 60°C) retirando-se eventuais bolhas de ar e, em seguida, procedeu-se à eluição do óleo de cáalamo puro, variedade européia, com o próprio éter, utilizando-se um volume final de 350 ml. O éter eluiu praticamente todos os componentes do óleo, como também parte das asaronas; por isso, foi necessário reeluir o extrato obtido, passando numa nova coluna de alumina, repetindo-se por três vezes essa operação, para eliminação total desses compostos.

O extrato etéreo isento de α e β -asaronas, além de mais dois componentes que são eluídos após as frações de asaronas, possivelmente sesquiterpênicos, foi concentrado em banho-maria à temperatura de 40 a 60°C, com auxílio de corrente de nitrogênio.

O controle da presença de α e β -asaronas residuais no extrato foi feito através de cromatografia em fase gasosa, como já descrito no trabalho anterior¹⁹.

Métodos

Toxicidade aguda em camundongos

Utilizaram-se, para determinação de DL50, 260 camundongos de ambos os sexos, com peso médio de 30 g.

Em todos os experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas para adaptação, com ração e água *ad libitum* até 12 horas antes da experiência. A partir de então, suspendeu-se a ração e foi-lhes dado somente água.

Os animais, em grupos de 10, foram separados e as drogas administradas intraperitonealmente em doses variáveis de 100,0 a 337,5 mg/kg no caso do óleo de cálamu, variedade indiana Jammu, e de 150,0 a 1139,1 mg/kg para o óleo de cálamu, variedade européia, assim como nos ensaios com o óleo isento de α e β -asaronas.

A dose de α -asarona variou de 100,0 a 759,4 mg/kg, enquanto a da β -asarona, de 100,0 a 337,5 mg/kg. Todas as drogas foram injetadas em solução de óleo de soja com volume final de 0,2 ml/camundongo, sendo, em seguida, os camundongos observados por 24 horas, quanto ao seu comportamento e letalidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toxicidade aguda em camundongos

A tabela 1 apresenta os dados relativos aos grupos de animais tratados com o óleo de cálamu, variedade indiana, por via intraperitoneal.

Conforme mostra a tabela, a administração de 225,0 mg/kg de óleo acarretou a morte da quase totalidade dos animais, que atingiu a 100% com a administração da dose de 337,5 mg/kg, dentro do período de 24 horas de observação.

Os animais dos grupos III e IV, correspondentes às doses de 225,0 e 337,5 mg/kg, logo após a administração das drogas mostraram depressão seguida de convulsão, vindo a falecer logo em seguida.

A DL50 do óleo de cálamu indiano em camundongos, por via intraperitoneal, foi de $154,5 \pm 1,1$ mg/kg (tabela 1). Quanto ao óleo de cálamu, variedade européia, e ao extrato oleoso isento de α e β -asaronas (tabelas 2 e 3, respectivamente), em virtude de suas baixas toxicidades agudas, não foi possível a determinação dos valores de DL50.

Conforme a tabela 2, a injeção de até 337,5 mg/kg da droga não provocou a morte em nenhum dos animais, que chegou apenas a 20% para as doses elevadas de 506,3 e 1139,1 mg/kg.

TABELA 1

Determinação de DL50 do óleo de cálamu, variedade indiana, por via intraperitoneal, em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	3 h	4 h	
I	100,0	0	0	1	0	10
III	150,0	0	3	0	0	30
II	225,0	0	7	2	0	90
IV	337,5	3	7	—	—	100

DL50 = $154,5 \pm 1,1$ mg/kg.

TABELA 2

Determinação de DL50 do óleo de cálamu, variedade européia, por via i.p., em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	150,0	0	0	0	0	0
II	225,0	0	0	0	0	0
III	337,5	0	0	0	0	0
IV	506,3	0	1	0	1	20
V	759,4	0	0	0	1	10
VI	1139,1	0	0	1	1	20

Toxicidade em embriões de galinha

Utilizaram-se 600 ovos de galinha "Garrinson", com dimensões relativamente uniformes, escolhidos ao acaso, de suprimento comercial.

Os ovos foram colocados em incubadora elétrica e, após 96 horas, foram submetidos ao exame ovoscópico. Do total foram rejeitados 106 ovos, correspondentes a 17,67%, por apresentarem embriões não desenvolvidos ou em precárias condições de desenvolvimento, tendo sido utilizados, efetivamente, 494 ovos.

A inoculação foi feita segundo o esquema de OGA¹³, no 8.º dia. A experiência foi conduzida em duas etapas e, em todos os ovos, foi injetado um volume constante de 0,2 ml de solução no saco vitelino, variando apenas as concentrações das drogas administradas. As doses variaram de 0,15 a 15 mg/kg para os três óleos utilizados, a variedade indiana Jammu, a européia e o óleo isento de α e β -asaronas. Para os componentes α e β -asaronas, as doses variaram de 0,04 a 4,00 mg/kg. Em todos os experimentos, constituiu-se um grupo-controle que recebeu somente o óleo de soja em volume de 0,2 ml/ovo.

As etapas seguintes seguiram o mesmo procedimento usado por YABIKU et alii¹⁹.

*Teste de Ames*¹

Foram utilizadas cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 e TA 1535, com e sem adição da fração S₀ (extrato de fígado de rato, induzido por Aroclor 1254).

As concentrações de β -asarona utilizadas foram de 10, 50, 100, 200 e 500 μ g/placa. Todas as diluições foram feitas com DMSO (dimetilsulfóxido) e as contagens foram realizadas após 72 horas de incubação a 35°C.

Métodos estatísticos

Valemo-nos, neste trabalho, dos seguintes tipos de testes:

Método de probito, segundo técnica de MILLER & TAINTER¹² para determinação da DL 50

Análise de variância, de acordo com o método recomendado por GRANER⁹ para determinação de atividade teratogênica. Nos casos em que a variável era representada em valores percentuais, estes foram transformados em arco-senso; quando a análise de variância mostrou valor significativo, complementou-se então com o teste de contraste entre médias de Tukey¹⁵.

Usou-se, em todos os cálculos, o nível crítico para rejeição de hipótese de nulidade, igual ou menor que 0,1 (10%). Para caracterizar os valores estatisticamente significantes usou-se um asterisco.

Em relação aos animais tratados com o extrato oleoso, a morte atingiu, como era esperado, apenas um máximo de 10% (tabela 3). Este extrato oleoso, obtido através da cromatografia em coluna a partir de óleo de cálammo europeu, estava isento de α e β -asaronas e, ainda, de dois compostos sesquiterpênicos que não conseguimos reter na coluna. Pelo valor de DL 50 observado para o extrato oleoso, de qualquer forma a toxicidade destes dois compostos parece ser relativamente baixa.

Os valores de DL 50 para o óleo de cálammo citados por diferentes autores apresentam sensível variação (tabela 4). Tal variação parece ser dependente principalmente da via de administração e da espécie animal utilizadas^{3, 5, 6, 16}.

TABELA 3

Determinação de DL50 do óleo de cálammo, variedade européia, isento de α e β -asaronas, por via intraperitoneal, em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	150,0	0	1	0	0	10
II	225,0	0	0	0	0	0
III	337,5	0	1	0	0	10
IV	506,3	0	0	0	0	0
V	759,4	0	0	0	0	0
VI	1139,1	0	0	0	0	0

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cáalamo em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

TABELA 4

Valores de DL50 do óleo de cáalamo obtidos por diferentes autores

Espécie animal	Via de administração	Variedade de óleo de cáalamo	DL50 (mg/kg)	Referência
cobaias	i.p.	indiana	275	3
camundongos	i.p.	indiana	177	5
ratos	i.p.	indiana	221	4
ratos	p.o.	indiana	777	15
ratos	i.p.	européia	299	18
camundongos	i.p.	indiana	155	presente trabalho
camundongos	i.p.	européia	>1139	presente trabalho
camundongos	i.p.	européia, isenta de asaronas	>1709	presente trabalho

i.p. = intraperitoneal.

p.o. = via oral.

O óleo de cáalamo da variedade indiana, administrado por via intraperitoneal, exhibe toxicidade cerca de três vezes maior do que a provocada por via oral, fato, aliás, compreensível, um vez que a absorção de qualquer substância através da cavidade intraperitoneal é rápida¹⁸.

Quanto à espécie animal, segundo dados obtidos por DANDIYA et alii⁵, DANDIYA & CULLUMBINE⁶ e CHOPRA et alii³, os camundongos parecem ser mais sensíveis do que os ratos e cobaias.

O valor de DL 50 obtido no presente trabalho para o óleo de cáalamo variedade indiana é ligeiramente menor em relação aos relatados por DANDIYA et alii⁵ e CHOPRA et alii³. Esta diferença pode ser atribuída a fatores pertinentes ao próprio sistema biológico ou ao teor dos princípios ativos contidos no óleo. Dentre os princípios ativos que as plantas do gênero *Acorus* encerram, α e β -asaronas são tidas como as principais responsáveis pela toxicidade do óleo essencial. Por exemplo, a concentração de β -asaronas no óleo oscila desde traços na variedade americana ou diplóide até cerca de 80% na variedade indiana Jammu ou tetraplóide (tabela 5).

TABELA 5

Teor de óleo essencial e de β -asaronas em diferentes variedades do óleo de cáalamo, segundo CAVAZZA²

Variedade	Óleo essencial no rizoma seco (%)	β -asaronas no óleo essencial (%)
americana (diplóide)	2,17	traços
européia (triplóide)	1,50-4,80	2,50-9,50
indiana Jammu (tetraplóide)	5,00-6,82	77,12-82,00
Kashmir (hexaplóide)	1,40	4,60

A diferença entre o valor encontrado na nossa experiência e o citado por CHOPRA et alii³ é certamente devida ao fator espécie animal, ao passo que pequena diferença verificada em relação ao valor citado por DANDIYA & CULLUMBINE⁶ é atribuível à variação da concentração de β -asarona nas amostras estudadas. A propósito, a nossa amostra continha 92,8% de β -asarona.

As tabelas 6 e 7 mostram, respectivamente, os dados relativos aos animais tratados com α e β -asaronas isoladas. A administração de α -asarona na dose de 759,4 mg/kg levou à morte dos 100% dos animais. A DL 50 foi de $225,5 \pm 1,1$ mg/kg intraperitoneal em camundongos.

Como mostra a tabela 7, a letalidade 100% foi causada com a dose de 337,5 mg/kg de β -asarona, de modo semelhante ao ocorrido com os animais dos grupos III e IV tratados com β -asarona, que mostraram depressão

seguida de convulsão vindo a falecer em pouco tempo. A DL50 da β -asarona foi de $184,2 \pm 1,0$ mg/kg administrados intraperitonealmente em camundongos.

Assim, os valores da DL50 de α e β -asaronas mostram ser de toxicidades relativamente altas, sendo o valor para α -asarona sensivelmente maior do que o da β -asarona e ambos semelhantes ao do óleo.

Os valores de DL50 das α e β -asaronas reportados na literatura, bem como os obtidos no presente trabalho, são mostrados na tabela 8.

A DL50 de α -asarona, 275 mg/kg, constante de INDEX MERCK¹¹, apesar de estar próxima da encontrada por SHARMA & DANDIYA¹⁴ e da obtida no presente trabalho, parece na verdade ser a DL 50 do óleo de cálamó e não da α -asarona; o Index Merck não faz menção da fonte bibliográfica daquela informação.

TABELA 6

Determinação da LD50 da α -asarona, intraperitonealmente, em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	100,0	0	0	1	0	10
II	150,0	0	0	0	3	0
III	225,0	0	1	1	0	20
IV	337,5	0	0	0	9	90
V	506,3	0	0	0	8	80
VI	759,4	0	0	0	10	100

DL 50 = $225,5 \pm 1,1$ mg/kg.

TABELA 7

Determinação da DL50 da β -asarona, intraperitonealmente, em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Morte em				Porcentagem de mortalidade
		1 h	2 h	12 h	24 h	
I	100,0	0	0	0	0	0
II	150,0	0	0	1	0	10
III	225,0	3	5	1	0	90
IV	337,5	4	6	—	—	100

DL 50 = $184,2 \pm 1,0$ mg/kg.

TABELA 8

Valores da DL50 de α e β -asaronas em diferentes experimentos

Drogas	Espécie animal	Via de administração	DL50 (mg/kg)	Referências
α -asarona	ratos	i.p.	300	13
α -asarona	cobaias	i.p.	275	11, 16
α -asarona	camundongos	i.p.	226	presente trabalho
β -asarona	ratos	i.p.	122	13
β -asarona	camundongos	i.p.	184	presente trabalho

i.p. = intraperitoneal.

Comparando os dados da DL 50 encontrados para β -asarona e para óleo de cálamu, variedade indiana, a toxicidade relativamente maior encontrada para o óleo pode ser explicada em termos de sinergismo com algum outro componente presente.

Toxicidade em embriões de galinha. Atividade teratogênica

No que concerne à embriotoxicidade, não há nenhum dado na literatura que se refira a experiências ou comprove a existência de atividade teratogênica no óleo de cálamu, tendo o assunto já sido revisto por nós em trabalhos anteriores¹³, quando referimos a não existência de embriotoxicidade do óleo integral da variedade européia.

Neste trabalho, o estudo da toxicidade em embriões de galinha foi realizado a fim de

verificar eventual atividade teratogênica efetuada para os seguintes componentes: óleos de cálamu da variedade indiana e européia, extrato oleoso isento de α e β -asaronas e os componentes α e β -asaronas independentemente.

O estudo foi realizado em 2 etapas: a primeira experiência foi feita com os óleos de variedades diferentes e com o extrato oleoso isento de α e β -asaronas, enquanto que, na outra, testaram-se os α e β -asaronas separadamente.

Na primeira experiência, o desenvolvimento dos embriões, no grupo controle, foi da ordem de 86%, enquanto que o dos embriões tratados com o extrato oleoso isento de asaronas, em doses variáveis de 0,15 a 15,0 mg/ovo, foi sensivelmente menor (tabela 9).

TABELA 9

Letalidade em embriões de galinha inoculados com óleos de cálamu, variedades indiana, européia e extrato oleoso isento de α e β -asaronas

Grupos	Doses (mg/ovo)	Embriões inoculados	Embriões mortos	Letalidade média (Porcentagem \pm desvio padrão)
Controle		28	4	14,2 \pm 1,4
Óleo de Cálamu, variedade indiana	0,15	28	28	100,0 \pm 0,0
	1,50	28	28	100,0 \pm 0,0
	15,00	28	28	100,0 \pm 0,0
Óleo de Cálamu, variedade européia	0,15	28	24	86,7 \pm 5,8
	1,50	28	24	85,8 \pm 1,4
	15,00	28	28	100,0 \pm 0,0
Extrato oleoso isento de α e β asaronas	0,15	28	3	10,0 \pm 0,0
	1,50	28	6	21,7 \pm 3,5
	15,00	28	9	32,5 \pm 4,3

Já os embriões tratados com o óleo de cálammo, tanto da variedade européia quanto da indiana, mostraram percentagem elevada de letalidade. Os embriões tratados com o óleo de cálammo europeu, nas doses de 0,15 e 1,5 mg/ovo, mostraram letalidade praticamente igual, enquanto que na dose de 15,0 mg/ovo, a letalidade atingiu a 100%.

A mortalidade igual a 100% foi observada nos embriões tratados com o óleo de cálammo indiano, desde a dose de 0,15 mg/ovo até 15,0 mg/ovo. Embora se reconheça a importância de se verificar a letalidade dos embriões com doses menores dessa amostra, em virtude do objetivo deste trabalho, que era apenas verificar eventual teratogenia, tal experiência não foi realizada.

A avaliação estatística dos dados foi feita pelo método de análise de variância, onde se utilizaram "índices de letalidade", calculados pela relação entre a percentagem de letalidade causada pela droga em questão e a percentagem de letalidade do grupo controle (tabela 10). Por essa análise verificamos que é insig-

nificante a variação dos índices de letalidade em função das doses aplicadas, porém é significativa em função das drogas. O teste de contraste entre médias de Tukey revela que há diferença significativa entre diversos tratamentos a que foram submetidos os embriões de galinha. Assim entre os tratados com a variedade européia e com o extrato oleoso, bem como entre os tratados com a variedade indiana e com o extrato oleoso, ocorrem diferenças significativas; já entre os tratados com as variedades indiana e européia, a diferença não foi significativa.

Na segunda experiência, onde se estudou a ação de α e β -asaronas isoladas, o desenvolvimento dos embriões no grupo controle foi da mesma ordem daquele obtido na experiência anterior.

A letalidade dos embriões tratados com α -asarona diferiu apenas sensivelmente entre as doses administradas de 0,04 a 4,00 mg/ovo. O mesmo não ocorreu com os embriões tratados com β -asarona nessas mesmas doses,

TABELA 10

Índice de letalidade em embriões de galinha inoculados com óleo de cálammo, variedade indiana, européia e extrato oleoso isento de α e β -asaronas

(Continua)

Drogas Doses (mg/kg)	Óleo de Cálammo		Extrato oleoso isento de α e β -asaronas
	Variedade indiana	Variedade européia	
0,15	4,1	3,1	0,8
1,50	4,1	3,1	1,3
15,00	4,1	4,1	1,6

Análise de variância dos índices de letalidade da tabela 10

Fonte de Variação	ϕ	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Entre drogas	2	1350,2	675,1	64,7 *
Entre doses	2	57,6	28,8	2,8
Resíduo	4	41,8	10,4	—
Total	8	1449,6	—	—

* Significativo $P \leq 0,1$.

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cálamó em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

Análise de variância da tabela 10

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Entre grupos	2	1350,2	675,1	40,7 *
Resto	6	99,4	16,6	—
Total	8	1449,6	—	—

* Significativo $P \leq 0,1$.

Teste de contraste entre médias de Tukey

(conclusão)

Tratamentos	\bar{X}	$\bar{X}_I - \bar{X}_R$	$\bar{X}_E - \bar{X}_{EXT.}$
Variedade indiana	41,0	—	—
Variedade européia	34,3	6,7	—
Extrato oleoso isento de asaronas	12,3	28,7*	22,0*

* Significativo $P \leq 0,1$.

$$Q_{cal.} = \frac{\sqrt{Q_{MR}}}{\sqrt{n_i}} = \frac{\sqrt{16,6}}{\sqrt{3}} = 2,35$$

$$T = Q_{cal.} \times Q_{critico}$$

$$T = 2,35 \times 4,34$$

$$T = 10,2$$

enquanto que, com a administração de β -asarona na dose de 0,04 mg/ovo, cerca de 43% dos embriões apresentaram evolução normal até os últimos dias de incubação; com doses de 0,4 e 4,00 mg/ovo, a morte atingiu quase a totalidade dos embriões tratados (tabela 11).

A análise de variância efetuada sobre os índices de letalidade em embriões de galinha inoculados com α e β -asaronas demonstrou ser insignificante a variação em função das drogas ou das doses utilizadas (tabela 12).

Nas duas experiências realizadas para verificar a eventual atividade teratogênica, não se constatou nenhum caso de malformação entre os sobreviventes.

O estudo da atividade teratogênica permite concluir que o óleo de cálamó de diferentes variedades, assim como as α e β -asaronas são incapazes de produzir efeito teratogênico em embriões de galinha. A mesma conclusão não é inteiramente extensível ao ser humano, porém é um indicio bastante favorável da ausência de atividade teratogênica.

TABELA 11

Valores percentuais de letalidade dos embriões-controle e dos inoculados com α e β -asaronas

Grupos	Doses (mg/ovo)	Embriões inoculados	Embriões mortos	Letalidade média (%) \pm D.P.
Controle	Óleo de soja	30	4	13,3 \pm 5,8
α -asarona	0,04	30	15	50,0 \pm 0,0
	0,40	30	16	53,3 \pm 5,8
	4,00	30	18	60,0 \pm 0,0
β -asarona	0,04	30	17	56,7 \pm 5,8
	0,40	29	26	89,7 \pm 0,6
	4,00	30	30	100,0 \pm 0,0

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cálcio em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

TABELA 12

Índice de letalidade em embriões de galinha inoculados com α e β -asaronas

Doses (mg/ovo)	Drogas	α -asarona	β -asarona
	0,04		2,1
0,40		2,2	3,3
4,00		2,4	4,2

Análise de variância dos índices de letalidade da tabela 12

Fonte de Variação	ϕ	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Entre drogas	1	160,2	160,2	5,0
Entre doses	2	121,0	60,5	1,9
Resíduo	2	64,3	32,2	—
Total	5	345,5	—	—

$P \leq 0,1$

TABELA 13

Média de resultados de três ensaios para cada concentração

β -asarona ($\mu\text{g/placa}$)	Média do número de colônias revertentes por placa											
	TA 98						TA 100					
	Sem S_0			Com S_0			Sem S_0			Com S_0		
	C	T	MR	C	T	MR	C	T	MR	C	T	MR
10	31	34	1,08	36	30	0,88	187	192	1,01	218	163	1,13
50	35	56	1,60	47	32	0,85	204	219	1,07	157	195	1,24
100	35	63	1,61	47	57	1,21	204	205	1,01	177	222	1,41
200	31	42	1,23	36	38	1,10	187	151	0,79	153	192	1,26
500	31	31	0,92	44	36	0,86	204	235	1,56	153	185	1,19

C = Controle T = Teste

MR = Razão de Mutagenicidade

Amostra positiva MR $\geq 2,0$

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cálamu em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

TABELA 14

Média de resultados de três ensaios para cada concentração

β -asarona ($\mu\text{g/placa}$)	Média do número de colônias revertentes por placa					
	TA 1535					
	Sem S_0			Com S_0		
	C	T	MR	C	T	MR
10	100	91	1,15	37	40	1,17
50	145	138	0,47	48	60	1,32
100	145	127	0,90	48	55	1,17
200	100	99	1,57	37	37	1,09
500	100	98	0,91	37	38	0,89

C = Controle T = Teste

MR = Razão de Mutagenicidade

Amostra positiva $\geq 2,0$

Teste de Ames — atividade mutagênica

Os resultados dos ensaios realizados em triplicata, com a β -asarona nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g/placa}$ são mostrados nas tabelas 13 e 14; somente em concentração de 500 $\mu\text{g/placa}$ e superiores, a β -asarona mostrou toxicidade positiva, enquanto que para as outras concentrações foram negativas.

Na razão de mutagenicidade (MR) de todas as concentrações, em todos os ensaios, nenhuma apresentou resultado maior ou igual a 2,0, levando a concluir que a β -asarona não apresenta atividade mutagênica. Este resultado

confirma os achados de HSIA et alii¹⁰ mas não os de GOGGELMANN & SCHIMMER⁹. Uma das explicações pode ser a diferença do indutor usado para a obtenção do sistema enzimático microsossomal de rato ou S_0 que, no nosso caso, foi o Aroclor 1254 e, no desse autor, Clophen A50. Este assunto merece novos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Petra Sanches, da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), pela orientação nos ensaios de mutagenicidade.

RIALA6/589

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Toxicity of α and β -asarone, and calamus oil for mice, chick embryos, and mutagenicity for *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

ABSTRACT: The LD50 was 154.5 mg per kg of mice injected intraperitoneally with calamus oil obtained from the Indian variety, while oil from the European variety had unmeasurable toxicity. The LD₅₀ was 184.0 mg/kg for β -asarone and 226.0 mg/kg for α -asarone. There was no teratogenic activity in chick embryos injected with either calamus oil (Indian or European variety) or α -asarone, or β -asarone. Mean mortality varied from 10 to 100%. Ames test showed no mutagenic activity when β -asarone was added, at concentrations of 10, 50, 100, 200 or 500 mcg to plates growing *Salmonella typhimurium*. The activator factor present in liver extracts from rats after induction with Aroclor 1254 did not influence the lack of mutagenicity.

DESCRIPTORS: α and β -asarone, toxic effect in mice and chick embryos; α and β -asarone, mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*; calamus oil, toxic effect in mice and chick embryos; calamus oil, mutagenic activity in *S. typhimurium*.

YABIKU, H.Y.; OGA, S.; LAJOLO, F. & ANDRIGHETTI, H. — Efeitos tóxicos de α e β -asaronas e do óleo de cálamus em camundongos, embriões de galinha e mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):1-12, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMES, B.N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. — Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31:347-64, 1975.
2. CAVAZZA, G. — Les chimiotypes parmi les plantes aromatiques cas du calamus polyploid. *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 69: 833-44, 1976.
3. CHOPRA, I.C.; KHAJURIA, B.N. & CHOPRA, C.L. — Antibacterial properties of volatile principles from *Alpinia galanga* and *Acorus calamus*. *Antibiot. Chemother.*, 7:378-83, 1957.
4. COUNCIL OF EUROPE — *Natural flavouring substances, their sources, and added artificial flavouring substances*. Strasburg, 1974. p. 34.
5. DANDIYA, P.C.; BAXTER, R.M.; WALKER, G.C. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus*, part II: investigation of volatile oil. *J. Pharm. Pharmacol.*, 11:163-8, 1959.
6. DANDIYA, P.C. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus*. III. Some pharmacological actions of the volatile oil. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 125:353-9, 1959.
7. ESTADOS UNIDOS. National Institute for Occupational Safety and Health. *Registry of toxic effects of chemical substances*. [s.l.] 1977. v. 2, p. 166.
8. GOGGELMANN, W. & SCHIMMER, O. — Mutagenicity testing of B-asarone and commercial calamus drugs with *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 121:191-4, 1983.
9. GRANER, E.A. — *Estatística*. 2.^a ed. São Paulo, Melhoramentos, 1966. p. 92-3.
10. HSIA, M.R.S.; ADAMOVICS, J.A. & KREAMER, B.L. — Microbiological mutagenicity studies of insect growth regulators and other potential insecticidal compounds in *Salmonella typhimurium*. *Chemosphere*, 8:521-9, 1979, apud *Chem. Abstr.*, 91: 187657p, 1979.
11. The MERCK index: an encyclopedia of chemicals and drugs. 9thed. Rahway, N.J., Merck Co., 1976. p. 110.
12. MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. — Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 57:261-4, 1944.
13. OGA, S. — Atividade teratogênica dos cloretos de samário e gadolínico em embrião de galinha. *Rev. Fac. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 7:259-84, 1969.
14. SHARMA, J.D. & DANDIYA, P.C. — Studies on *Acorus calamus*. VI. Pharmacological actions of asarone and β -asarone on cardiovascular system and smooth muscles. *Indian J. med. Res.*, 50:61-5, 1962.
15. SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. — *Biochemistry*. San Francisco, W.H. Freeman, 1969. 776 p.
16. TAYLOR, J.M.; JONES, W.I.; HAGAN, E.C.; GROSS, M.A.; DAVIS, D.A. & COOK, E.L. — Toxicity of oil of calamus (Jammu variety). *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 10: 405, 1967.
17. WOJTOWICZ, E.J. — Spectrofluorometric determination of β -asarone in sweet and dry vermouths. *J. agric. Food Chem.*, 24: 526-8, 1976.
18. YABIKU, H.Y.; OGA, S. & LAJOLO, F.M. — Efeitos tóxicos do óleo de *Acorus calamus*. Estudo preliminar em ratos e embriões de galinha. *An. Farm. Quím. São Paulo*, 19: 252-8, 1979.
19. YABIKU, H.Y. & LAJOLO, F. — Determinação de β -asarona em bebidas alcoólicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:135-45, 1980.

Recebido para publicação em 4 de junho de 1984.

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE SUJIDADES EM FARINHA DE ROSCA *

Claydes de Quadros ZAMBONI **
Regina Maria Morelli Silva RODRIGUES **

RIALA6/590

ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):13-20, 1985.

RESUMO: Foram analisadas, através do exame microscópico, amostras de farinha de rosca, a fim de testar dois métodos de digestão e extração de sujidades: o método que utiliza a pancreatina e o que utiliza a solução de Tween-Versene. Concluiu-se que o método que utiliza a pancreatina é o mais sensível. A pesquisa de sujidades em 131 amostras do comércio, utilizando o método de digestão com pancreatina, levou à conclusão de que 69,4% das amostras estavam contaminadas com fragmentos de insetos e 19,8%, com pêlos de roedores, demonstrando que as condições de produção desse tipo de alimento são bastante precárias.

DESCRIPTORIOS: farinha de rosca, impurezas, análise microscópica.

INTRODUÇÃO

Sujidade é considerada qualquer substância estranha que possa contaminar um alimento. Esta substância pode ser de origem biológica, como insetos, fragmentos de insetos, produtos do metabolismo de insetos, ácaros, fragmentos de ácaros, produtos do metabolismo de ácaros, excrementos e pêlos de roedores, fragmentos podres ou qualquer outro tipo de material como areia, terra, vidro e metal.

A legislação brasileira exige ausência de sujidades em todo tipo de alimento^{5,6}. Entretanto, em nosso trabalho de pesquisa, temos observado a contaminação em vários tipos de alimento, entre eles em farinha de rosca, sendo, neste caso, constituída principalmente por fragmentos de insetos e pêlos de roedores.

Para a pesquisa de sujidades leves, como os fragmentos de insetos e pêlos de roedores, emprega-se o método de digestão com pancreatina, seguida da extração das sujidades, utilizando-se o frasco-armadilha de Wildman^{1,2}. A pancreatina é comumente usada em métodos microanalíticos para solubilizar o amido e a proteína existentes nos produtos alimentícios. O amido alterado, principal-

mente o alterado pelo calor, é quase que totalmente hidrolisado e pode ser filtrado em papel de filtro (filtração rápida). A proteína é digerida pela pancreatina, que afeta muito pouco a cutícula dos insetos⁶. Este método faz uso de uma enzima de preço elevado, a pancreatina; além disso, exige controle de temperatura e do pH e é demorado, o que dificulta a conclusão da análise.

Reverendo a literatura a respeito da recuperação de sujidades, encontramos o método do Tween-Versene^{2,4,7}, rápido e de fácil execução, descrito para extração de sujidades em farinha de centeio.

O papel do Versene (sal tetrassódico do ácido etilenodiaminotetracético) na presença do Tween-80 (monooleato de polioxietileno sorbitano) parece ser o de um depressor para componentes de produtos alimentícios que tendem a flutuar, possivelmente, hidrolisando e solubilizando as proteínas; é também um agente sequestrante e quelante de íons metálicos. Traços de Ca, Mg, Fe e outros íons metálicos são sequestrados por este composto quelante e transformados em complexos metálicos solúveis. Por sua propriedade de formar tais complexos, o Na₂EDTA, em conjunto com o Tween-80, um agente tensoativo, podem

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

adsorver partículas na superfície do alimento, de modo a manter o agente extrator de sujidades (Varsol), livre dessas partículas.

O frasco-armadilha de Wildman é utilizado para a extração de sujidades leves. Utiliza um óleo mineral, como agente extrator, no qual flutuam fragmentos de insetos e pêlos de roedores por terem a propriedade de ser oleofílicos.

A finalidade deste trabalho é a de comparar os dois métodos de extração de sujidades em farinha de rosca e verificar qual o método mais adequado para análise desse tipo de alimento e, ao mesmo tempo, verificar as condições higiênicas das farinhas de rosca comercializadas na cidade de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Foram preparadas 26 amostras-padrão de farinha de rosca, contaminadas no laboratório com 10 élitros de Coleóptero e 10 pêlos de rato.

Paralelamente, foram analisadas 131 amostras de farinha de rosca comercializadas na cidade de São Paulo, colhidas pela Divisão de Alimentação Pública da Coordenadoria de Saúde da Comunidade da Secretaria da Saúde, nos supermercados, mercearias e padarias.

Tanto as amostras-padrão, como as do comércio foram analisadas pelo método de digestão com pancreatina e de Tween-Versene, descritos no "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" e no "Approved Methods of American Association of Cereal Chemists"^{1, 2, 3, 4}.

Método de digestão com pancreatina

Reagentes

Água a 40°C

Na₃PO₄ a 5%

Solução de pancreatina

Formol

Varsol

Técnica — Pese 50 g de farinha de rosca em um béquer de 600 ml; adicione 50 ml de pancreatina diluída com 100 ml de água e misture bem, desmanchando os grumos. Dilua com água até um volume de 460 ml e ajuste o pH a 8, com solução de Na₃PO₄ a 5%. Reajuste o pH depois de 15 minutos e novamente depois de 45 minutos.

Adicione, agitando, 3 gotas de solução de formol e deixe digerir por 16 a 18 horas à temperatura ambiente ou menor que 40°C. Transfira a solução para o frasco de Wildman usando 30 ml de varsol. Agite vigorosamente a haste do frasco, fazendo movimentos ascen-

descentes e descendentes para misturar bem o Varsol, a água e a amostra. Faça fortes movimentos de rotação, até que o líquido se ponha a girar. Evite perda ou derrame da amostra. Complete o volume do frasco com água a 40°C e, durante 20 minutos, agite a camada inferior com intervalos de 3 a 6 minutos. Deixe a mistura em repouso por 10 minutos. Após este tempo, gire a rolha para remover o sedimento e sifone.

Transfira o líquido para um béquer, lavando o gargalo do frasco com varsol. Repita a extração usando 20 ml de varsol. Filtre o material extraído a vácuo, em um funil de Büchner com papel de filtro e examine-o no microscópio estereoscópico, e verifique se existem fragmentos de insetos e pêlos de roedores.

Método Tween-Versene

Reagentes

Etanol a 60%

Tween-80 alcoólico (Junte 210 ml de etanol a 60% e 40 ml de Tween-80, misture e filtre)

Versene (Dissolva 5 g de Na₂EDTA em 160 ml de água, junte 150 ml de etanol, misture e filtre)

Técnica — Pese 50 g de farinha de rosca e coloque no frasco-armadilha de 2 litros. Junte 300 ml de etanol a 60% e misture. Sem interrupção, junte 250 ml de Tween-80 alcoólico, 250 ml de Versene e 70 ml de Varsol. Misture e complete o volume do frasco com etanol a 60%.

Agite a haste ocasionalmente durante os 20 minutos seguintes. Decorrido este tempo, gire a rolha para remover fragmentos que tenham ficado na superfície, sem perturbar o material restante no fundo do frasco.

Deixe em repouso pelo período de uma hora. Durante este tempo a haste deve ficar acima do depósito de farinha (pode ser presa a um suporte) a fim de não ficar muito material aderindo à rolha de borracha. Sifone, sem agitar, separando as camadas; lave o gargalo do frasco com álcool a 60% e filtre. Repita a extração usando 40 ml de Varsol, deixe em repouso por uma hora e meia. Filtre o material extraído, a vácuo, em funil de Büchner com papel de filtro, e examine-o no microscópio estereoscópico.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise de comparação entre os métodos de extração de sujidades em farinha de rosca encontram-se relacionados nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, apresentadas a seguir.

TABELA 1

Recuperação de sujidades em amostras padrão de farinha de rosca contaminadas no laboratório com 10 élitros e 10 pêlos de rato

Amostra n.º	Método da Pancreatina		Método do Tween-Versene	
	N.º de élitros	N.º de pêlos	N.º de élitros	N.º de pêlos
1	10	3	8	3
2	10	3	2	4
3	10	4	2	6
4	10	7	4	4
5	9	8	2	4
6	4	6	2	3
7	10	7	2	6
8	9	6	2	1
9	10	10	8	4
10	10	7	2	2
11	10	6	2	2
12	9	10	2	2
13	10	7	1	4
14	7	8	3	4
15	6	6	2	1
16	10	10	2	0
17	10	9	3	4
18	10	8	2	0
19	6	3	1	1
20	10	8	8	6

TABELA 2

Comparação entre os dois métodos de extração de sujidades, nas amostras padrão, em percentagem de recuperação

Contaminação	Método da Pancreatina	Método do Tween-Versene
	Percentagem de recuperação	Percentagem de recuperação
Élitro	90	30
Pêlo de rato	68	30,5

TABELA 3

Sujidades em amostras de farinha de rosca colhidas no comércio da cidade de São Paulo

Amostra n.º	Método da Pancreatina		Método do Tween-Versene	
	Fragmentos de insetos	Pêlos de roedores	Fragmentos de insetos	roedores Pêlos de
1	2	0	0	3
2	1	0	1	0
3	2	3	3	4
4	1	0	2	0
5	1	1	3	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	1	1	0
10	0	2	1	0
11	2	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	2	0
14	0	0	0	0
15	3	0	0	0
16	0	0	0	0
17	5	1	3	2
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	1	4	0	1
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	1	0	0	0
24	0	0	0	0
25	3	0	9	0
26	6	0	5	0
27	0	0	1	0
28	7	0	3	0
29	0	0	0	0
30	1	0	0	0
31	8	5	9	12
32	4	1	5	0
33	2	0	0	0
34	2	1	3	2
35	0	0	0	0
36	56	3	9	0
37	14	5	6	5
38	0	0	0	0
39	2	0	0	0
40	15	5	4	0
41	0	0	0	0
42	4	1	2	1
43	4	0	5	1
44	0	0	0	0
45	0	0	1	1
46	4	0	0	0
47	13	3	0	0

TABELA 4

Comparação entre os métodos da Pancreatina e do Tween-Versene em percentagem de amostras condenadas

Amostras	Método da Pancreatina				Método do Tween-Versene			
	Amostras contendo				Amostras contendo			
	Fragmentos de insetos		Pêlos de roedores		Fragmentos de insetos		Pêlos de roedores	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%
Condenadas	26	55,3	14	29,7	21	44,6	10	21,2
Aprovadas	21	44,7	33	70,3	26	55,4	37	78,8
Total	47	—	47	—	47	—	47	—

TABELA 5

Sujidades em farinhas de rosca, colhidas no comércio da cidade de São Paulo, extraídas pelo método de digestão com pancreatina

(*Continua*)

Amostras n.º	Fragmentos de insetos	Pêlos de roedores
1	4	0
2	3	0
3	7	0
4	18	0
5	35	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	7	0
10	1	0
11	5	0
12	2	0
13	0	0
14	8	1
15	2	0
16	4	2
17	10	0
18	4	0
19	9	0
20	46	0
21	2	0
22	11	0
23	2	0
24	20	0
25	7	0
26	0	0
27	10	0
28	4	0
29	10	0
30	2	0
31	1	0
32	0	0
33	11	2
34	3	3

(conclusão)

Amostra n.º	Fragmentos de insetos	Pêlos de roedores
35	2	1
36	1	4
37	0	0
38	6	0
39	2	0
40	3	0
41	4	0
42	4	2
43	2	0
44	2	0
45	6	2
46	1	0
47	4	0
48	1	0
49	1	0
50	0	0
51	1	0
52	1	0
53	25	0
54	2	0
55	3	0
56	1	0
57	0	0
58	4	0
59	0	0
60	2	0
61	2	0
62	0	0
63	4	0
64	1	3
65	0	0
66	0	0
67	0	0
68	3	0
69	0	0
70	29	1
71	4	0
72	57	0
73	18	0
74	1	2
75	0	0
76	2	0
77	1	0
78	5	0
79	0	0
80	0	0
81	1	0
82	0	0
83	10	0
84	13	3

DISCUSSÃO

Verificando os resultados das tabelas 1, 2, 3 e 4 podemos observar que o método da pancreatina, embora apresentando os inconvenientes apontados na introdução, mostrou maior sensibilidade do que o de Tween-Versene, quando empregados em amostras-padrão de farinhas de rosca preparadas no laboratório e nas amostras colhidas no comércio.

Dando continuidade à pesquisa de sujidades em amostras de farinha de rosca colhidas no comércio, desta vez utilizando unicamente o método da digestão com pancreatina, observamos que, em 84 amostras, 77,1% estavam contaminadas com fragmentos de insetos e 14,4% com pêlos de roedores (tab. 5).

No total das 131 amostras colhidas no comércio, 69,4% estavam contaminadas com fragmentos de insetos e 19,8% estavam contaminadas com pêlos de roedores.

Esse resultado já era esperado, devido as condições de preparo da farinha de rosca.

As sobras de pão vão sendo armazenadas nas padarias, para serem transformadas em farinha; as condições de armazenamento, de um modo geral, são insatisfatórias, ocor-

rendo então a contaminação da matéria-prima, fato que é acusado na análise do produto.

A farinha de rosca que contém pêlos de roedores é imprópria para o consumo, pois os pêlos são um indicio de que a matéria-prima foi contaminada com excrementos de roedores, que são, por sua vez, fontes potenciais de patógenos.

CONCLUSÃO

Pesquisando sujidades em farinhas de rosca, empregando-se dois métodos de digestão, o da pancreatina e do Tween-Versene, concluiu-se que o método da pancreatina é o mais sensível.

Das 131 amostras de farinhas de rosca comercializadas na cidade de São Paulo, verificou-se que 69,4% estavam contaminadas com fragmentos de insetos, em condições higiênicas insatisfatórias e 19,8% estavam contaminadas com pêlos de roedores, sendo impróprias para o consumo. Este fato leva-nos a concluir que as condições desse tipo de alimento são bastante precárias, sendo necessário, portanto, manter rigoroso e assíduo controle neste tipo de produto.

RIALA6/590

ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. — A comparison of methods for detection of filth in surplus-bread flour. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2): 13-20, 1985.

ABSTRACT: Filth was detected in 131 samples of surplus-bread flour sold in the city of São Paulo. Two methods for extraction of light filth: pancreatin and Tween-Versene methods were employed. The pancreatin method seemed to be more sensitive. It was found that 69.4% of the samples were contaminated with insect fragments and 19.8% with rodent hairs. The samples contaminated with insect fragments and rodent hairs are obviously improper for human consumption. The source of rodent hairs was apparently rodent feces which are potential transmitters of infections.

DESCRIPTORS: surplus-bread flour, filth, microscopical analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS — *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8th ed. St. Paul, Minnesota, AACC, 1983. v. 1 (AACC method 28-31).
2. Ibid. (AACC method 28-60).
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12th ed. Washington, AOAC, 1975. p. 818. (Seccion 18.652).
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* 13th ed. Washington, DC, AOAC, 1980. p. 793. (Seccion 44.055).
5. BRASIL, Leis, decretos etc. — Resolução n.º 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11613-4. Aprova as Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas)...

ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):13-20, 1985.

6. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION — *Training manual for analytical entomology in the food industry*, edited by J.R. Gorham. Washington, DC, FDA, 1977. p. 78-84 (FDA tech. bull. n.º 2)
7. NICHOLSON, J.F. — Report on extraneous materials in cereal grains, cereal products, and confectionery. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 38:264-66, 1955.
8. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. — Decreto n.º 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 23 (NTA 47). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas...

Recebido para publicação em 5 de junho de 1984.

CASCAS DE SEMENTE DE CACAU EM CHOCOLATE EM PÓ *

Claydes de Quadros ZAMBONI **
Helena Ide ALVES **
Nazareth SPITERI **

RIALA6/591

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I. & SPITERI, N. — Cascas de semente de cacau em chocolate em pó. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):21-25, 1985.

RESUMO: Foram analisadas 40 amostras de chocolate em pó, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, a fim de se determinar a porcentagem de cascas de semente de cacau, utilizando o método da contagem de vasos espiralados. Concluiu-se que todas as amostras continham cascas e que 47,5% das mesmas continha porcentagem de cascas além dos limites tolerados por legislações internacionais. Foi sugerida modificação no Código Brasileiro de Alimentos a fim de permitir um limite de até 1,75% de cascas de semente de cacau em chocolate em pó. Essa tolerância poderia ser estendida à massa de cacau e a outros derivados do mesmo.

DESCRITORES: chocolate em pó, detecção de cascas de sementes de cacau; método microscópico para contagem de vasos espiralados.

INTRODUÇÃO

As cascas de semente de cacau (*Theobroma cacao*) em massa de cacau e produtos derivados podem ser acusadas ao exame microscópico através da presença de vasos espiralados e de células pétreas, provenientes do parênquima esponjoso do espermoderma^{7, 9, 10}.

A legislação vigente no Brasil exige ausência de cascas de semente de cacau em chocolate em pó^{3, 8}. Entretanto, as legislações de outros países, como Estados Unidos e Argentina, toleram nesse tipo de produto até 1,75 e 4%, respectivamente^{1, 4}.

A pesquisa de cascas em produtos de cacau por microscopia é qualitativa, através da obtenção da fibra bruta e exame microscópico do resíduo obtido após o tratamento com álcalis, segundo o método oficial do Ministério da Agricultura Britânico⁹. A fibra bruta é constituída por elementos histológicos resistentes dos vegetais, principalmente por tecidos esclerenquimáticos, que são os elementos mais característicos e mais utilizados para identificação microscópica.

No processo tecnológico a que é submetida a semente de cacau, não há possibilidade de

obtenção de massa de cacau completamente isenta de cascas. Desse modo, essa impureza aparecerá obrigatoriamente nos produtos derivados de cacau, inclusive no chocolate em pó. Por esse motivo, resolvemos empregar um método quantitativo, que permitisse verificar em que condições estão os chocolates em pó quanto à presença de cascas.

A finalidade deste trabalho foi a de utilizar um método quantitativo para contagem de cascas de semente de cacau em chocolate em pó e verificar se há possibilidade de fixarmos um limite de tolerância para essa impureza, a fim de propor modificação no Código Brasileiro de Alimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 40 amostras de chocolate em pó comercializadas na cidade de São Paulo, segundo a técnica preconizada em "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists"², com algumas modificações no preparo da amostra, porque foi necessário retirar o açúcar para facilitar a pulverização e o desengorduramento

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 8.º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Itabuna, 1985.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODO

Material

- Tamis 230 mesh, com 13 cm de diâmetro
- Moinho Labconco n.º 900
- Placa de alumínio com 7,7 cm de diâmetro e 3,3 cm de altura, com tampa
- Gral de vidro com 13 cm de diâmetro e pistilo de vidro
- Pincel n.º 10 de náilon com cerdas de 1,5 a 1,75 cm de comprimento
- Cadinho de vidro (6 cm de diâmetro) com placa porosa (porosidade média)
- Câmara de Howard

Equipamento

- Microscópio óptico com aumento de 100 a 400 x

Método

Pese 40 g do chocolate em pó, coloque em um frasco Erlenmeyer com 60 ml de álcool a 80% para retirar o açúcar; feche o frasco com tampão de algodão e leve-o ao banho-maria. Quando o álcool entrar em ebulição, retire o Erlenmeyer do banho-maria, deixe-o esfriar e filtre o conteúdo em papel de filtro sob vácuo. Deixe em temperatura ambiente até que seque, transfira o material do papel para um gral, pulverize bem.

Pese 15 g do chocolate em pó do qual já foi retirado o açúcar; transfira para um Erlenmeyer de 100 ml com tampa esmerilhada, adicione 50 ml de éter e agite cuidadosamente para extrair a gordura.

Monte um equipamento utilizando um funil de vidro de 15 cm de diâmetro, um tamis n.º 230 mesh e um copo graduado de 500 ml de capacidade. Apóie o funil em um anel, coloque o tamis no interior do funil e o copo graduado sob a haste do funil.

Transfira o material do Erlenmeyer para o tamis. Lave o material do tamis com éter e deixe secar por cerca de 15 minutos. Coloque o tamis com o cacau já seco sobre a bandeja do tamis. Force a passagem do material do tamis para a bandeja, utilizando o pincel n.º 10. Transfira o material que restou no tamis para um gral de 12,5 cm e triture por cerca de 1 minuto. Transfira novamente o material para o tamis e torne a forçar a passagem do material para a bandeja, utilizando o pincel. Repita as triturações e pinceladas até que, praticamente, todo o material tenha passado através do tamis.

Transfira o material da bandeja, inclusive pequena porção que tenha sido retida pelo tamis (< 20 mg), através do funil para o copo de 500 ml. Lave o tamis, a bandeja, o gral, o pistilo e o funil com éter, recebendo

as águas de lavagem no copo de 500 ml. Remova todo o material que tenha restado nos utensílios com um bastão contendo na ponta um tubo de borracha, lave com éter e recolha no copo através do funil. Agite cuidadosamente o material do copo, por 10 minutos. Deixe decantar e despreze o sobrenadante. Adicione 100 ml de éter e repita a extração. Coloque o cadinho de placa porosa numa alonga de vidro e, esta, num aparelho para filtração a vácuo.

Transfira o material do copo para o cadinho, usando éter. Lave duas vezes com cerca de 35 ml de éter e continue a sucção até que seque, por cerca de 20 minutos. Transfira quantitativamente o material do cadinho para um gral de vidro e pulverize. Use o bastão com extremidade protegida por borracha para retirar todo o material da placa porosa.

Transfira o material pulverizado para a placa de alumínio. Misture bem. Seque em banho-maria de 10 a 15 minutos para remover traços de éter, e coloque a placa em estufa pelo período de uma hora à temperatura de 100°C.

Pese 0,175 g do material seco e desengorjurado em um béquer de 50 ml. Adicione cuidadosamente 12,5 ml de solução de hidróxido de sódio a 4%.

Aqueça até a fervura em bico de Bunsen com tela de amianto, em seguida, coloque em chapa elétrica e ferva por 2 minutos, agitando frequentemente. Deixe esfriar e transfira o material do béquer para um tubo de centrifuga, de "Pyrex", de 2,5 x 10 cm, com pequenas porções de água. Centrifugue com velocidade de 3.500 rpm até que clareie (cerca de 15 minutos).

Deixe decantar e despreze o sobrenadante. Adicione água ao tubo até cerca de 3/4 da capacidade. Tampe o tubo e agite para que o resíduo fique bem disperso. Centrifugue e decante como anteriormente.

Adicione água ao tubo até cerca da metade da capacidade; tampe o tubo e agite para que o material fique bem disperso. Transfira a solução para uma proveta graduada de 50 ml contendo 25 ml de glicerina, lavando o tubo com pequenas porções de água. Tampe a proveta e agite; adicione 25 ml de água e agite novamente. Transfira o material para um béquer de 30 ml de capacidade, agite bem e, enquanto o material estiver em movimento, transfira uma pequena gota da mistura para uma câmara de Howard.

Com o microscópio ajustado para contagem de cogumelos (campo de 1,382 mm com aumento de 100 x), conte os vasos espiralados com aumento de 200 x em 25 campos de 8 lâminas preparadas para cada determinação (total de 400 campos). Considere como campo positivo o que apresentar qualquer fragmento de vaso espiralado, mas nenhum que seja menor que um S ou um Z. Calcule a média dos resultados e

TABELA 1

Valores padrões de contagem de vasos espiralados

Porcentagem de cascas no composto de chocolate	Contagem de vasos espiralados	
	≤ 15% de cascas	> 15% de cascas
0	4,5	1,5
1	15	5,8
2	24,4	9,7
3	32,8	13,2
4	40	16,6
5	47	19,7
8	62,2	27,7
11	72,9	34,8
15	83,4	42,4
20	91,1	50,1
30	98,2	62,1
60	—	80,0
100	—	86,8

Fonte: JACKSON, M.M. 5.6.

considere como percentagens de campos positivos presentes.

Determine a percentagem de casca no chocolate comparando com a curva-padrão preparada através da contagem de vasos espiralados plotada contra percentagens de cascas de chocolate, conforme mostra a tabela 1. Utilize a coluna de contagem de vasos espiralados sob a citação ≤ 15% de cascas.

Para percentagem de cascas entre 1 e 15% (contagem de vasos espiralados entre 15 e 83,4), a fórmula seguinte dá valores comparáveis à tabela 1.

$$S = (538P - 1777) \div (7043 - 50P)$$

S = cascas no composto de chocolate

P = contagem de vasos espiralados

Para amostras contendo percentagem de cascas maior que 15% (contagem de vasos espiralados maior que 83,4), repita as determinações pelo mesmo processo, mas utilizando

como amostra 0,200 g do material desengordurado diluído em 100 ml de água e colocado em proveta contendo 50 ml de glicerina.

Faça as contagens com aumento de 200 x. Construa a curva-padrão, utilizando a coluna de contagem de vasos espiralados sob a citação > 15% de cascas (ver tabela 1).

RESULTADOS

Os resultados por nós obtidos estão relacionados na tabela 2.

Utilizando as percentagens de cascas de semente de cacau obtidas nas amostras analisadas e comparando-as com a percentagem do nível de tolerância do padrão americano, que é de 1,75%, foi considerada aceitável a amostra cuja percentagem de cascas era no máximo de 1,75, e inaceitável a amostra cuja percentagem de cascas estava acima de 1,75.

TABELA 2

Contagem de vasos espiralados e percentagem de cascas de semente de cacau em chocolate em pó

Chocolate em pó amostra n.º	Contagem de vasos espiralados n.º	Cascas de semente de cacau %
1	17,5	1,24
2	11,5	0,68
3	29	2,47
4	30	2,59
5	30	2,59
6	27,5	2,29
7	18,5	1,33
8	18	1,28
9	30,5	2,65
10	34	3,09
11	18,5	1,33
12	23	1,79
13	30	2,59
14	27,5	2,29
15	33	2,96
16	30	2,59
17	19,5	1,43
18	16,5	1,14
19	13	0,82
20	15,5	1,04
21	46,5	4,93
22	43,5	4,44
23	49,5	5,44
24	50,5	5,62
25	14	0,91
26	20,5	1,54
27	19	1,38
28	21,5	1,64
29	20,5	1,54
30	19,5	1,43
31	12	0,73
32º	11	0,68
33	41	4,06
34	44,5	4,60
35	19	1,48
36	21	1,58
37	30,5	2,65
38	26	2,13
39	20	1,50
40	21	1,60

Classificando, de acordo com o critério exposto na p. 23, as unidades de aceitáveis e inaceitáveis, encontramos os resultados apresentados na tabela 3.

TABELA 3

Classificação das amostras de chocolate em pó, comparando com os padrões internacionais fixados de 1,75% de cascas de semente de cacau

Amostras	Número e percentagem
aceitáveis	21 (52,5)
inaceitáveis	19 (47,5)

CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos, verificou-se que 52,5% das amostras analisadas continham percentagem de cascas de cacau dentro dos limites fixados de 1,75%. Das amostras analisadas, 47,5% estavam em desacordo com esse padrão. Por esse motivo, sugerimos que seja modificada a norma técnica relativa a chocolate, constante nas Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas⁸, vigente no Brasil, substituindo a exigência de ausência de cascas em chocolate em pó para uma tolerância de até 1,75%, de acordo com os padrões internacionais. Esta tolerância também pode ser estendida à massa de cacau e a outros produtos derivados de cacau.

RIALA6/591

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I. & SPITERI, N. — Presence of cocoa-seed shells in powdered chocolate. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):21-25, 1985.

ABSTRACT: The method of spiral-vessel count for cocoa-seed shells was applied to 40 commercial samples of powdered chocolate. The counts disclosed that 52.5% of the samples met the 1.75% limit for shell content permitted by international food standards. It is suggested that the Brazilian legislation could tolerate up to 1.75% cocoa-seed shells in chocolate.

DESCRIPTORS: chocolate, powdered, cocoa-seed shells detection; microscopic spiral-vessel count method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARGENTINA. Ministerio de Salud de la Nación — Reglamento alimentario, aprobado por Decreto n.º 141/53. Buenos Aires, Impr. centr. Ministerio Salud Publica de la Nación, 1953. p. 176-7.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of Analysis*. 13th ed. Washington, DC, AOAC, 1980. p. 201 (Seccion 13.015).
3. BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução normativa n.º 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11.509. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)...
4. ESTADOS UNIDOS. Federal Food, Drug and Cosmetic Act — *The drug amendments of 1962, legislative history: reports, bill, debate, act*. [Washington, DC, Pharmaceutical Manufacturers Association, 1963]
5. JACKSON, M.M. — A spiral vessel count method for estimating pectic acid in cocoa and related products. *J. Assoc. off. agric. Chem.*, 45:554-6, 1962.
6. JACKSON, M.M. — Collaborative study of a spiral vessel count method for estimating shell in the chocolate component of cocoa and related products. *J. Assoc. off. agric. Chem.*, 51:725-35, 1968.
7. MENEZES, J.B.F. — A estrutura microscópica de sementes oleaginosas comestíveis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 18:5-44, 1958.
8. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. — Decreto 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 21. (NTA 40). Aprova Normas Técnicas Especiais relativas a Alimentos e Bebidas.
9. WALLIS, T.E. — *Microscopia analítica: sus fines, y metodos en relación a los alimentos, água, especiais y medicamentos*. Trad. por Jaime Gallego Berengerer. Zaragoza, Acribia, 1968. p. 148-68.
10. WINTON, A.L. & WINTON, K.B. — *The structure and composition of foods*. New York, John Wiley, 1939. v. 4, p. 114-35.

Recebido para publicação em 5 de junho de 1984.

PARTICULAS METALICAS EM FARINHA DE TRIGO *

Claydes de Quadros ZAMBONI **
Helena Ide ALVES **
Nazareth SPITERI **
Regina Maria Morelli Silva RODRIGUES **

RIALA6/592

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Partículas metálicas em farinha de trigo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):27-29, 1985.

RESUMO: Foram analisadas 460 amostras de farinha de trigo, recolhidas no comércio da cidade de São Paulo, nas diferentes fases de processamento, com a finalidade de pesquisar partículas metálicas. Constatou-se que 43,69% das amostras não apresentavam partículas metálicas, 28,04% apresentavam de 1 a 50 filamentos, 27,61% apresentavam de 1 a 50 grânulos, 3,70% apresentavam de 51 a 100 grânulos, 1,74% de 101 a 150 grânulos e 6,52% das amostras apresentavam número de grânulos metálicos maior que 150. Em 16,09% das amostras foram encontrados tanto grânulos como filamentos metálicos. Concluiu-se que a presença de partículas metálicas na farinha traduz as condições de conservação e tecnologia dos moinhos. Foi enfatizado que a presença de partículas metálicas em alimentos pode causar risco potencial à saúde.

DESCRITORES: farinha de trigo, detecção microscópica de partículas metálicas.

INTRODUÇÃO

A produção e o processamento de muitos de nossos alimentos envolvem peneiração, corte, pulverização e o contato com superfícies metálicas, o que nos faz prever que haja alguma contaminação com partículas metálicas.

Em um levantamento feito por SELBY⁹ (1954), em 147 indústrias de alimentos, verificou-se que os contaminantes mais frequentemente encontrados em matérias-primas e nos produtos finais eram partículas metálicas, predominantemente o ferro.

CHATT² (1964) relatou que as causas mais comuns de contaminação eram o desgaste da maquinaria — principalmente durante operações de peneiração, a laminação, o ajuste de juntas e ligações e a perda de parafusos.

Em 1972, CUNNINGHAM³ realizou um estudo em vários tipos de produtos, utilizando um método no qual as partículas metálicas

eram isoladas por atração magnética, medidas e pesadas. Relatou a presença de partículas metálicas nas farinhas de trigo, trigo integral, centeio, aveia, milho, germe de trigo, arroz, cacau, chocolate e em outros tipos de alimentos.

No ano de 1978, na cidade de São Paulo, houve uma denúncia, feita por funcionários, sobre a contaminação da farinha de trigo produzida pelo moinho em que trabalhavam. De fato, ao analisarmos a farinha, constatamos a presença de grande quantidade de partículas metálicas ferromagnéticas. Desde esta ocorrência até meados de 1984, temos analisado trigo em grão e farinha, pesquisando partículas metálicas.

A finalidade deste trabalho foi a de analisar farinhas de trigo, nas várias fases de processamento, a fim de verificar a presença de partículas metálicas. Estas podem ser provenientes não só do equipamento (moinho) como também de matéria-prima mal preparada para a moagem.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 4.º Congresso Brasileiro de Farmácia e Bioquímica e 5.º Congresso Paulista de Farmacêuticos, São Paulo, 1985.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 460 amostras de farinha de trigo, colhidas nos moinhos da cidade de São Paulo, nas várias fases de processamento.

Os métodos de análise foram os preconizados pelo "Official Methods of Analysis of the Association of the Analytical Chemists"¹ e o das Normas Sanitárias Pan-americanas², para sujidades pesadas, em que são usados clorofórmio e tetracloreto de carbono como meios de sedimentação, e que detalhamos a seguir:

"Pese 50 g de amostra em um bquer de 250 ml. Adicione clorofórmio até faltar cerca de 1 cm para completar a capacidade do recipiente. Misture cuidadosamente e deixe sedimentar durante cerca de 30 minutos, agitando a superfície do líquido de vez em quando. Cuidadosamente, decante a camada de clorofórmio, de modo que o resíduo de sujidades pesadas permaneça no fundo do bquer. Antes de decantar, observe se a camada superficial clorofórmica não ficou tão compacta de modo a tornar dificultosa a operação.

"Dobre o volume do material que ficou no bquer com igual volume de tetracloreto de carbono; deixe sedimentar novamente e decante, como na etapa anterior. Repita este processo usando como meio de sedimentação mistura de clorofórmio e tetracloreto de carbono em partes iguais, até que reste pouco tecido vegetal no fundo do bquer. Transfira o resíduo do bquer para um papel de filtro de 7 cm de diâmetro, tendo linhas paralelas riscadas a uma distância de 5 mm entre si, lave com jatos de clorofórmio e tetracloreto de carbono, filtre a vácuo. Depois de secar o papel à temperatura ambiente, examine-o ao microscópio estereoscópico."

Foram consideradas positivas as amostras que apresentavam partículas magnéticas e, conforme o aspecto, as partículas foram denominadas filamentos ou grânulos. Estas partículas também foram medidas e contadas^{5, 7, 10}.

RESULTADOS

Os resultados obtidos da análise de partículas metálicas em farinha de trigo são exemplificados nas tabelas 1 e 2, de modo a complementar as informações já expostas no item anterior.

TABELA 1

Partículas metálicas em farinha de trigo

Partículas metálicas	Amostras	
	n.º	%
Ausência	201	43,69
Filamentos	58	12,61
Grânulos	127	27,61
Grânulos e filamentos	74	16,09
Total	460	100,00

TABELA 2

Aspecto e tamanho de partículas metálicas em 460 amostras de farinha de trigo analisadas

N.º de partículas metálicas	Amostras de farinha de trigo com			
	filamentos (1,4 mm)		grânulos (0,3 mm)	
	N.º	%	N.º	%
1 a 50	129	28,04	127	27,61
51 a 100	0	0,00	17	3,70
101 a 150	0	0,00	8	1,74
> 150	0	0,00	30	6,52

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos na análise das farinhas de trigo, foi feita uma inspeção nos moinhos da cidade de São Paulo, pela Divisão de Alimentação Pública. Verificou-se que os resultados obtidos em laboratório traduziam as condições dos moinhos. Os que se encontravam com equipamento adequado, perfeito, e que utilizavam eletroímãs, tanto no início, como no fim da moagem, produziam farinha de trigo em que não foi constatada a presença de partículas metálicas.

Foi demonstrado que as partículas de ferro maiores do que 0,01 mm não são tão bem absorvidas pelo intestino quanto as menores do que 0,01 mm. Isto pode indicar que as partículas de ferro não são completamente dissolvidas pelo suco gástrico no estômago e podem passar através do intestino como partículas sólidas ⁶.

Não se sabe, ainda, se partículas de ferro menores que 1,5 mm de comprimento podem penetrar nas paredes do trato digestivo do homem. Foi demonstrado que fibras de asbesto maiores que 0,023 mm de comprimento passam através das paredes do trato digestivo, entram na corrente circulatória, e vão se localizar em órgãos vitais ⁴. As fibras de asbestos, entretanto, são mais ponteagudas do que as partículas metálicas e têm talvez maior possibilidade de furar as paredes intestinais. Entretanto, o grau de penetração de partículas metálicas na mucosa intestinal deve ainda ser pesquisado.

Podemos concluir que as farinhas de trigo estão contaminadas com partículas metálicas, que essa contaminação pode causar risco potencial à saúde e que, portanto, a fiscalização dos moinhos deverá ser contínua e rigorosa.

RIALA6/592

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Metal particles in wheat flour. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):27-29, 1985.

ABSTRACT: The presence of ferromagnetic particles was searched for in 460 samples of wheat flour. Particles were found in 56.31% of the samples, of which 28.04% contained from 1 to 50 metal filaments; 27.61% of the samples had 1 to 50 metal granules; 3.70% from 51 to 100 granules; 1.74% contained 101 to 150 granules; and 6.52% of the samples showed more than 150 granules. In 16.09% of the samples, both granules and filaments were detected. The results place in evidence the type of technology employed by mills. Attention is called to the potential pathogenic effect of metal particles for human beings.

DESCRIPTORS: wheat flour, metallic particles, microscopical detection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL — *Official methods of analysis of the Association of Official analytical chemists*. 12nd ed. Washington, DC, AOAC, 1975. Seção
2. CHATT, E.M. — Adventitious metals in processed foods. *World Rev. Nutr. Diet.*, 4: 141-56, 1964.
3. CUNNINGHAM, H.M. & O'BRIEN, R. — Ferromagnetic particles in foods. *J. Food Sci.*, 37:572-3, 1972.
4. CUNNINGHAM, H.M. & PONTEFRACT, R. apud CUNNINGHAM, H.M.³.
5. DE LUCA, P.P.; BODDAPATI, S. & IM, S. Guidelines for the identification of particles in parenterals. *FDA by Lines*, 10: 111-65, 1980.
6. HOGLUND, S. & REIZENSTEIN, P. — Studies in iron absorption. 5. Effect of gastrointestinal factors on iron absorption. *Blood*, 34:496, 1964.
7. MICROSCOPES, microscope techniques, photomicrography, and preparation of exhibits. *FDA by-Lynes*, 5:318-334, 1975.
8. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas de qualidade para alimentos*. São Paulo, 1967. p. 7-8. (OFSANPAN/IALUTZ M 02).
9. SELBY, J.W. apud CUNNINGHAM, E.M.³.
10. WALLIS, T.E. — *Microscopia analítica: sus fines y metodos en relacion a los alimentos, água, especias y medicamentos*. Trad. por Jaime Gallego Berenjerer. Zaragoza, Acribia, 1968. 318 p.

Recebido para publicação em 5 de junho de 1984.

PREVALÊNCIA DOS MARCADORES SOROLÓGICOS DA HEPATITE B EM SOROS DE BANCO DE SANGUE NA CIDADE DE SÃO PAULO *

Sandra Maria da ROCHA **
Regina Tomie KIMURA **
Carlos TATUTA **
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Araripe Pacheco DUTRA **
Edson Augusto de Sousa e SILVA **
Waldemar EBNER FILHO **
William Carlos ISHIY ***

RIALA6/593

ROCHA, S.M.; KIMURA, R.T.; TATUTA, C.; TAKEDA, A.K.; DUTRA, A.P.; SILVA, E.A.S.; EBNER FILHO, W. & ISHIY, W.C. — Prevalência dos marcadores sorológicos da hepatite B em soros de banco de sangue na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):31-36, 1985.

RESUMO: Foi realizado um estudo de prevalência do antígeno de superfície da hepatite B entre 17.401 doadores de sangue, através das reações de radioimunoensaio e hemaglutinação passiva reversa. Os resultados obtidos foram, respectivamente, de 1,27% e 1,13% com uma concordância de 89,14% entre as duas técnicas empregadas.

Em 139 amostras positivas para o antígeno de superfície da hepatite B, foi feita a pesquisa do antígeno "e" da hepatite B e do anticorpo correspondente, através da técnica de imunodifusão em gel de agarose, com uma positividade de 7,2% para o antígeno e 28% para o anticorpo. Não se observou nenhum caso positivo para ambos os marcadores numa mesma amostra.

Entre os soros negativos para o antígeno de superfície da hepatite B, foram selecionadas quatrocentas amostras a fim de se determinar a freqüência dos anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite B e o antígeno "core" da hepatite B, através da reação de radioimunoensaio. Verificou-se nessa amostragem que 7,25% possuíam somente anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite B, 4,5% apenas anticorpos contra o antígeno "core" da hepatite B e 10,5% apresentavam ambos os marcadores.

Um estudo mais cuidadoso deveria ser realizado com os soros positivos, apenas para o anticorpo contra o antígeno "core" da hepatite B, já que ainda se questiona sobre os riscos que eles representam na transmissão da hepatite B pós-transfusional.

DESCRITORES: hepatite B, antígeno; hepatite B, anticorpo.

INTRODUÇÃO

A transfusão de sangue constitui uma das maneiras pela qual a hepatite B é transmitida.

A utilização de testes de terceira geração, como a hemaglutinação passiva reversa

(HAPR) e o radioimunoensaio (RIE), para a pesquisa do antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs) no sangue de doadores, diminuiu acentuadamente o risco de transmissão, porém não o eliminou totalmente. Tal fato ocorre devido à baixa concentração do AgHBs (<2ng/ml) existente em alguns soros ou à presença deste antígeno sob a forma de imu-

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Hemoterapia Modelo — Serviços Médicos S/C Ltda., São Paulo, SP.

nocomplexos não detectáveis pelos testes usuais. LANDER et alii¹¹ e HOOFNAGLE et alii¹², verificaram que alguns soros que apresentavam o anticorpo contra o antígeno "core" da hepatite B (anti-HBc), na ausência de AgHBs, eram capazes de transmitir a infecção a seus receptores. Por outro lado, a presença do anticorpo contra o AgHBs (anti-HBs) seria indicativo de baixo risco para a ocorrência da hepatite B pós-transfusional (GOLDFIELD et alii⁴).

Em relação aos soros positivos para o AgHBs, tem se observado que estes apresentam uma maior infeciosidade quando apresentam o antígeno HBe, ao contrário dos soros com anti-HBe. Diferentes trabalhos^{14, 18} têm demonstrado a importância deste sistema antígeno-anticorpo como indicador de risco de transmissão do vírus da hepatite B. Sendo assim, os indivíduos portadores assintomáticos do AgHBs, quando apresentam o antígeno HBe, têm grandes probabilidades de transmitir o vírus a seus contactantes.

Diante disso, foi realizado um estudo para se determinar a prevalência do AgHBs, bem como dos demais marcadores sorológicos da hepatite B, entre os doadores de um Banco de Sangue da cidade de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

a) 17.401 soros provenientes de um Banco de Sangue da cidade de São Paulo, colhidos no período de abril de 1980 a dezembro de 1981, nos quais foi pesquisada a presença do AgHBs por radioimunoensaio (RIE) e hemaglutinação passiva reversa (HAPR).

b) 400 soros, selecionados ao acaso, entre os soros AgHBs negativos, para avaliação da frequência de anti-HBs, utilizando as técnicas de hemaglutinação passiva (HAP) e radioimunoensaio*; e de anti-HBc por radioimunoensaio**.

c) 139 soros AgHBs positivos, para a pesquisa do antígeno "e" da hepatite B (AgHBe) e seu respectivo anticorpo (anti-HBe), por imunodifusão em gel de agarose (IDGA) segundo técnica descrita por TAKAHASHI et alii¹⁸.

Antígeno

AgHBs proveniente de soros de portadores assintomáticos, purificado por cromatografia de afinidade em Sepharose 4B, ativada com brometo de cianogênio^{2, 7}.

Anti-soros

Anti-HBs proveniente de:

a) Soro hiperimune de cavalo e purificado por cromatografia de afinidade em Sepharose 4B^{2, 7}.

b) Soro hiperimune de bode, parcialmente purificado por precipitação com sulfato de amônio.

Radioimunoensaio para detecção de AgHBs ***

Foram utilizadas, como fase sólida, pérolas de poliestireno adsorvidas com anti-HBs de bode. O reagente radioativo foi obtido através da marcação de anti-HBs de cavalo com ¹²⁵I pelo método da Cloramina T (GREENWOOD et alii⁵), sendo o ensaio realizado de acordo com a técnica descrita por PURCELL & BARKER¹⁵.

Hemaglutinação passiva reversa ***

Para detecção do AgHBs: hemácias de carneiro, fixadas com glutaraldeído e sensibilizadas com anti-HBs purificado, de acordo com a técnica descrita por KIMURA et alii¹⁰.

Hemaglutinação passiva para detecção de anti-HBs ***

Os soros foram diluídos em placa de microtitulação na razão log 2, paralelamente em tampão diluente e tampão inibidor, contendo o antígeno específico. Posteriormente foram adicionados nos alvéolos hemácias de carneiro fixadas com glutaraldeído e sensibilizadas conforme a técnica de IMAI et alii⁶, com AgHBs purificado.

Após duas horas de incubação precedeu-se à leitura, onde os soros foram considerados positivos, quando havia uma diferença de, no mínimo, duas casas entre os títulos da reação propriamente dita e da inibição específica.

RESULTADOS

Em 17.401 soros testados para o antígeno de superfície da hepatite B, encontrou-se uma positividade de 1,27% (211 soros) através da técnica do RIE e 1,13% (197 soros) pela HAPR, conforme demonstra a tabela 1. Já a tabela 2 revela uma correlação entre a HAPR e o RIE de 89,14%. O AgHBs não foi detectado em 24 amostras, quando empregada a técnica HAPR, confirmando a sua menor sen-

* Conjunto de reagentes AUSAB, Abbott Laboratories, North Chicago, Ill., EUA.

** Conjunto de reagentes CORAB, Abbott Laboratories, North Chicago, Ill., EUA.

*** Todos os reagentes foram produzidos na Seção de Imunologia, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

sibilidade em relação ao RIE, entretanto demonstrou ser uma técnica com alta especificidade, já que não detectou nenhum caso falso positivo.

Na amostragem citada no item b, a pesquisa de anti-HBs, por RIE e por HAP, apresentou 21 (5,25%) soros positivos através das duas técnicas e 50 (12,5%) positivos somente pela técnica RIE, com uma concordância de 29,6% (tabela 3). A alta especificidade também foi demonstrada pela HAP, sem a ocorrência de casos falso-positivos.

Na tabela 4, verificou-se a ocorrência de anti-HBs e anti-HBc, pesquisados por RIE, onde se observou que 7,25% (29 soros) foram positivos somente para anti-HBs, 4,5% (18 soros) positivos somente para anti-HBc e 10,5% (42 soros) positivos para ambos os marcadores.

Na pesquisa do AgHBe e anti-HBe, em 139 soros positivos para AgHBs, pela técnica de IDGA, 7,2% dos soros foram positivos para o antígeno e 28% positivos para o anticorpo, não sendo observado nenhum caso positivo para os dois marcadores simultaneamente (ver tabela 5).

TABELA 1

Pesquisa de AgHBs, em 17.401 soros de doadores de um banco de sangue, pelas técnicas de RIE e HAPR

Técnicas	Soros positivos n.º (%)	Soros negativos n.º (%)
RIE	221 (1,27)	17.180 (98,73)
HAPR	197 (1,13)	17.204 (98,87)

TABELA 2

Comparação dos métodos de RIE e HAPR em 221 soros para pesquisa de AgHBs

Amostras	HAPR (+) e RIE (+)	HAPR (-) e RIE (+)	Total
Número	197	24	221
Porcentagem	89,14	10,86	100

(+) = positiva (-) = negativa

TABELA 3

Comparação das técnicas de RIE e HAP para pesquisa de anti-HBs em 400 soros de um banco de sangue

		H A P		Total
		Soros positivos N.º (%)	Soros negativos N.º (%)	
RIE	Soros positivos N.º (%)	21 (5,25)	50 (12,50)	71 (17,75)
	Soros negativos N.º (%)	0 (0%)	329 (82,25)	329 (82,25)
	Total	21 (5,25)	379 (94,75)	400 (100)

ROCHA, S.M.; KIMURA, R.T.; TATUTA, C.; TAKEDA, A.K.; DUTRA, A.P.; SILVA, E.A.S.; EBNER FILHO, W. & ISHIY, W.C. — Prevalência dos marcadores sorológicos da hepatite B em soros de sangue na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):31-36, 1985.

TABELA 4

Ocorrência de anti-HBs e anti-HBc em 400 soros de doadores de banco de sangue através da técnica de radioimunoensaio

ANTI-HBs ANTI-HBc	Soros positivos n.º (%)	Soros negativos n.º (%)	Total n.º (%)
Positivo n.º (%)	42 (10,5)	18 (4,5)	60 (15,0)
Negativo n.º (%)	29 (7,25)	311 (77,75)	340 (85,0)
Total n.º (%)	71 (17,75)	329 (82,25)	400 (100)

TABELA 5

Pesquisa do AgHBe e anti-HBe em 139 soros AgHBs positivos de doadores de banco de sangue por imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

IDGA	Soros positivos n.º (%)	Soros negativos n.º (%)
Ag HBe	10 (7,2)	129 (92,8)
Anti-HBe	39 (28,0)	100 (72,0)

DISCUSSÃO

A presente pesquisa reveste-se de grande importância devido, principalmente, a escassez de dados correlatos publicados em nosso meio. ANTONACIO¹, em 1971, utilizando as reações de imunoeletroforese cruzada (IEC) e IDGA, encontrou uma prevalência de 0,85% de antígeno Au e 0,05% de anti-Au entre 17.748 doadores de sangue não remunerados e 1,13% e 0,0% respectivamente, em 1.146 doadores profissionais. PEREIRA & CALLADO¹⁴, em 1972, estudando 2.081 doadores de sangue da cidade do Rio de Janeiro, encon-

traram uma positividade de 0,75% para o antígeno Au através da IEC e 0,38% por IDGA. Em 1975, ROSEMBLIT et alii¹⁶ detectaram o AgHBs em 0,21% de 22.473 doadores do serviço de hemoterapia do Hospital Servidor Público Estadual da cidade de São Paulo, utilizando a técnica de IEC. YOSHIDA et alii¹⁹, em 1979, encontraram uma prevalência de 2,05% de AgHBs e 7,69% de anti-HBs através da técnica de hemaglutinação passiva reversa e hemaglutinação passiva, em 195 soros de indivíduos de raça branca, na cidade de Londrina (PR). Em um estudo sobre a distribuição de marcadores sorológicos da hepatite B entre doadores de sangue

da América Latina¹³, encontrou-se uma prevalência de 2,1% para o AgHBs e 27,6 para o anti-HBc, empregando-se a técnica de RIE e 26,7% para o anti-HBs utilizando a reação de hemaglutinação passiva, em 1.022 amostras provenientes do Brasil. Entretanto, torna-se difícil a comparação desses dados devido à variação da origem da amostragem e da diferença na sensibilidade das técnicas empregadas.

A prevalência do AgHBs e do anti-HBs encontrada em nossa amostragem foi de 1,27% e 17,75%, respectivamente. De acordo com DEINHARDT & GUST³, estes resultados colocam-nos num padrão de prevalência intermediária comparável à que ocorre em regiões como Japão, Rússia, Sudoeste Asiático, Mediterrâneo e Europa Oriental.

A discordância observada entre a reação de HAPR e o RIE está de acordo com o esperado, já que os portadores assintomáticos apresentam antigenemia por longos períodos, e de modo geral não em níveis baixos. Já a alta discordância observada entre as reações de HAPR e RIE (29,8%) em favor desta última, na pesquisa do anti-HBs, pode ser explicada pelo fato de o anticorpo não permanecer indefinidamente nos mesmos níveis no sangue circulante, tornando-se indetectável com o decorrer do tempo. Desta maneira, a HAPR não seria capaz de detectar o anti-HBs no início e na fase final de seu aparecimento.

Nos soros AgHBs positivos, foi realizada a pesquisa do AgHBe e anti-HBe que detectou 7,2% e 28%, respectivamente. O índice

de soros positivos encontra-se provavelmente subestimado devido à baixa sensibilidade do método empregado. Seria conveniente a utilização de reações mais sensíveis, como o RIE, que detecta esses marcadores em mais de 90% das amostras.

O AgHBe é tido como um importante indicador do grau de infecciosidade do sangue^{14, 18}, o que torna recomendável uma maior atenção aos portadores deste marcador, devido a maior probabilidade que apresentam de estender a infecção aos seus contactantes.

Recentemente, alguns autores^{6, 12} observaram a transmissão da Hepatite B por indivíduos portadores de anti-HBc na ausência de AgHBs e anti-HBs, o que os levou a preconizar a triagem dos doadores para anti-HBc, como forma de reduzir a incidência da hepatite B pós-transfusional. Nesse caso, seriam eliminados os soros que apresentassem apenas anti-HBc, sem o anti-HBs, uma vez que a presença deste último indica índices reduzidos de transmissão do patógeno.

Em nosso estudo observamos uma prevalência de somente 4,5% de soros nesta situação. Porém, torna-se difícil avaliar a fase da infecção em que esses indivíduos se encontram: início da convalescência e infecção crônica (com possibilidade de transmissão).

Contrastando com os dados normalmente registrados na literatura pertinente, encontramos uma maior percentagem de anti-HBs (17,75%) em relação ao anti-HBc (15%). Tal fato será motivo de estudos posteriores.

RIALA6/593

ROCHA, S.M.; KIMURA, R.T.; TATUTA, C.; TAKEDA, A.K.; DUTRA, A.P.; SILVA, E.A.S.; EBNER FILHO, W. & ISHIY, W.C. — Prevalence of serological markers of hepatitis B in blood-bank donors from the city of São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):31-36, 1985.

ABSTRACT: A study of the hepatitis B surface antigen (HBsAg) prevalence was carried out in 17,401 blood-bank donors from the city of São Paulo using radioimmunoassay (RIA) and reverse passive hemagglutination (R-PHA) tests. The results were 1.27% and 1.13%, respectively, with a correlation of 89.14% between the two techniques. Detection of hepatitis Be antigen (HBeAg) and the respective antibody (anti-HBe) was made in 139 HBsAg positive sera by means of agarose gel immunodiffusion test (AGID). A positivity of 7.2% for the antigen and 28% for the antibody was obtained. The presence of both markers in the same serum specimen was not observed. Four hundred specimens were selected among the HBsAg negative sera to study the prevalence of the antibody against HBsAg (anti-HBs) and hepatitis B core antigen (anti-HBc) by radioimmunoassay. The results showed that 7.25% were positive for anti-HBs only, 4.5% for anti-HBc, and 10.5% showed both markers. A more careful study of sera positive for anti-HBc only, would be necessary since it is still questionable whether these specimens may represent a transmission risk for the post-transfusion Hepatitis B.

DESCRIPTORS: hepatitis B, antigen; hepatitis B, antibody.

ROCHA, S.M.; KIMURA, R.T.; TATUTA, C.; TAKEDA, A.K.; DUTRA, A.P.; SILVA, E.A.S.; EBNER FILHO, W. & ISHIY, W.C. — Prevalência dos marcadores sorológicos da hepatite B em soros de sangue na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):31-36, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTONASCIO, F. — Antígeno Australia em doadores de Sangue. São Paulo, 1971. 77 p. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]
2. AXEN, R. & ERNBACK, S. — Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *Eur. J. Biochem.*, 18:351-360, 1971.
3. DEINHARDT, F. & GUST, I.D. — Viral hepatitis. *Bull. WHO*, 60:661-91, 1982.
4. GOLDFIELD, M.; BLACK, H.C.; BILL, J.; SRIHONGSE, S. & PIZZUTI, W. — The consequence of administering blood pre-test for HBsAg by third generation techniques: a progress report. *Am. J. med. Sci.*, 270:335-42, 1975.
5. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M. & GLOVER, J.S. — The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Bioch. J.*, 89: 114-23, 1963.
6. HOOFNAGLE, J.H. et alii — Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *New Eng. J. Med.*, 298:1379-83, 1978.
7. HOUVEN, B.; GOUDEAU, A. & DANKERT, J. — Isolation of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by affinity chromatography on antibody coated immunoadsorbents. *J. immunol. Methods*, 8:185-94, 1975.
8. IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. — Hemmagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of australia antigen. *Immunology*, 27:871-8, 1974.
9. KATCHKI, J.N.; SIEM, T.H.; BROUWER, R.; BRANDT, K.H. & VAN DER WAART, M. — Detection and significance of anti-HBc in the blood bank. Preliminary results of a controlled prospective study. *J. virol. Methods*, 2:119-25, 1980.
10. KIMURA, R.T.; TACHIBANA, C.F.; CURY, V.L. & TAKEDA, A.K. — Reações imunológicas para detecção do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:83-6, 1978.
11. LANDER, J.J.; GITNICK, G.L.; GELB, L.H. & ASCH, R.D. — Anticore antibody screening of transfused blood. *Vox sang.*, 34 (2):77-80, 1978.
12. MAZZUR, S.; NATH, N.; FANG, C.; BASTIANS, M.J.; MOLINARIS, J.L.; FAY, O.H.; LABRADOR GONZALES, G.; GONZALES, G.; GUTIERREZ, A.; JARAMILLO, C.; KATZ, R.; DEME LOPEZ, M.B.; LEVY, E.; MORALES AYALA, F.; RODRIGUES AMAYA, J.; RODRIGUES MOYADO, H.; TORRES R.A. & VELASCO, M. — Distribution of hepatitis B virus (HBV) markers in blood donors of 18 western hemisphere countries. Proceedings of the red cross latin american hepatitis B workshop. *Bull. Pan. Amer. Health Organ.*, 14:44-51, 1980.
13. OKADA, K.; KAMIYAMA, I.; INOMATA, M.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. — "e" antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *New Engl. J. Med.*, 294:746-9, 1976.
14. PEREIRA, J.M. & CALLADO, A.N.A. — Pesquisa do antígeno Australia nos doadores de sangue do Estado da Guanabara. *Bol. Inst. Est. Hematol. "Artur Siqueira Cavalcanti"*, Rio de J., 2:5-11, 1972.
15. PURCELL, R.H. & BARKER, L.F. — Hepatitis B virus. In: ROSE, N.R. & FRIEDMAN, H., ed. — *Manual of clinical immunology*. Washington, DC, American Society of Microbiology, 1976.
16. ROSEMBLIT, J.; TAKEI, K.; AMATO NETO, V.; MENDONÇA, J.S. & MELO, E. — Pesquisa do antígeno de hepatite B no soro de doadores de sangue em serviço de hemoterapia da cidade de São Paulo. *Rev. bras. Clin. terap.*, 4:121-2, 1975.
17. SHIKATA, R.; KARASANA, T.; ABE, K.; UZAWA, T.; SUZUKI, H.; ODA, T.; IMAI, M.; MAYUMI, M. & MORITSUGU, Y. — Hepatitis B, e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J. infect. Dis.*, 136:571-6, 1977.
18. TAKAHASHI, K.; IMAI, M.; TSUDA, F.; TAKAHASHI, T.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. — Association of Dane particles with "e" antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.*, 117:102-5, 1976.
19. YOSHIDA, C.F.T.; GASPARI, A.M.C.; MARZOCH, K.B.F. & SCHATZMAYR, H.G. — HBsAg, subtypes and HBsAb in the white and asiatic populations from urban and rural communities in the South of Brazil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 10:106-9, 1979.

Recebido para publicação em 6 de junho de 1984.

AValiação DA PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA NO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA EM DIVERSOS PERÍODOS EVOLUTIVOS DA DOENÇA *

Maricy Alves RIBEIRO **
Zélia Maria de Oliveira CAVALCANTE ***
Deíza Márcia LOPES **
Raquel Bellinati Robert PIRES **
Márcia de Souza Carvalho MELHEM **
Antonella GODANO **
Massami KAWARABAYASHI **
Thais Helena Sampaio VIANNA **

RIALA6/594

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; VIANNA, T.H.S. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):37-42, 1985.

RESUMO: Foram realizadas provas de hemaglutinação passiva em amostras séricas de 189 pacientes com leptospirose, distribuídas quanto ao período decorrido após início dos sintomas. Os resultados foram comparados aos obtidos com a prova de referência, a sorroaglutinação microscópica. A hemaglutinação passiva revelou, na primeira amostra examinada, maior número de resultados positivos, estatisticamente significativa, a nível de 1%, no intervalo de 6 a 10 dias de doença, quando comparada à sorroaglutinação. Nos demais intervalos, os valores diagnósticos das provas foram aceitos como iguais. Os resultados sugerem que a prova de hemaglutinação passiva pode ser empregada no acompanhamento sorológico, como subsídio no estabelecimento do estágio da infecção leptospirótica.

DESCRIPTORIOS: leptospirose humana, imunodiagnóstico; prova de hemaglutinação passiva.

INTRODUÇÃO

O confronto de métodos utilizados no diagnóstico da leptospirose humana se faz necessário à medida em que se deseja incorporar à prática novas provas, atendendo-se à adequação dos laboratórios.

Em estudos anteriores^{5,7}, tivemos a oportunidade de verificar que há associação entre os resultados obtidos com a prova de hemaglutinação passiva (HAP) e com a prova-padrão recomendada pela Organização Mundial de Saúde⁴, a sorroaglutinação microscópica (SAM).

SULZER *et alii*⁸ avaliaram a prova de HAP no diagnóstico da leptospirose humana e não chegaram a concluir a respeito da

prova mais adequada em cada estágio da doença.

Neste trabalho estudou-se a prova de HAP comparativamente à SAM, em amostras séricas de pacientes com leptospirose comprovada clínica, epidemiológica ou laboratorialmente, tendo como objetivos: verificar seu valor diagnóstico em diferentes intervalos de dias de doença e avaliar sua contribuição no acompanhamento sorológico da infecção leptospirótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros analisados

Foram analisadas amostras séricas de 189 pacientes com leptospirose, internados no Hos-

* Realizado no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto de Saúde, São Paulo.

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; VIANNA, T.H.S. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):37-42, 1985.

pital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, no período de janeiro a abril de 1983. As informações a respeito da comprovação clínica, epidemiológica ou laboratorial, bem como a data do início dos sintomas, foram obtidas no Centro de Informações de Saúde do Estado de São Paulo. Duas ou mais amostras de 105 pacientes foram utilizadas na análise da evolução dos títulos.

Soroaglutinação microscópica

A prova de soroaglutinação microscópica foi realizada com 9 sorotipos patogênicos e 1 saprófita, conforme descrito em RIBEIRO *et alii*⁷. Foram considerados significativos títulos maiores ou iguais a 100, denominados positivos. Para o acompanhamento sorológico foram considerados os títulos obtidos nas reações com os sorotipos presumivelmente homólogos.

Hemaglutinação passiva

A prova de hemaglutinação passiva foi realizada empregando-se eritrócitos de carneiro fixados com glutaraldeído e sensibilizados com antígeno polissacarídico³ F, do sorotipo *patoc* Patoc I, conforme metodologia descrita em RIBEIRO *et alii*⁸. Foram considerados significativos, mencionados como positivos, os títulos maiores ou iguais a 128, bem como os casos com diferença de duas ou mais diluições entre duas amostras seriadas. A sistemática para a interpretação dessa prova foi alicerçada nos parâmetros de con-

cordância e sensibilidade, descritos em BUCK *et alii*².

Análise estatística

Na análise estatística dos resultados obtidos com as provas sorológicas, aplicou-se o teste de duas proporções para populações não independentes. No estudo da evolução dos níveis de anticorpos obtidos nas provas de HAP e SAM, calculou-se a média geométrica dos títulos para cada intervalo de dias de doença, conforme metodologia descrita em AMBROISE-THOMAS¹.

RESULTADOS

Considerou-se, para efeito de análise, a soroaglutinação microscópica como padrão. Os pacientes com sorologia positiva nesta prova foram designados "comprovados laboratorialmente". Desse modo, dos 189 pacientes analisados por ambas as provas, 152 (80,42%) foram comprovados laboratorialmente e apenas 37 (19,58%) foram confirmados somente através de dados clínicos e epidemiológicos compatíveis com a leptospirose (tabela 1).

A sensibilidade das provas de HAP e SAM foi de respectivamente 79,89% e 80,42% e a concordância entre ambas foi de 88,89%.

Na tabela 2 encontra-se a distribuição dos 152 pacientes, indicando-se o intervalo de tempo decorrido desde o início dos sintomas até a primeira sorologia positiva.

TABELA 1

Distribuição dos pacientes segundo as conclusões diagnósticas obtidas nas provas de HAP e SAM, após acompanhamento sorológico

SAM \ HAP	HAP		Total n.º (%)
	Positiva n.º (%)	Negativa n.º (%)	
Positivo	141 (74,6)	11 (5,82)	152 (80,42)
Negativo	10 (5,29)	27 (14,29)	37 (19,58)
Total	151 (79,89)	38 (20,11)	189 (100)

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; VIANNA, T.H.S. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):37-42, 1985.

TABELA 2

Distribuição dos pacientes com leptospirose, segundo o intervalo de dias da doença em que foi acusada a primeira sorologia positiva nas provas de SAM e HAP

Intervalo (dias)		1 — 5	6 — 10	11 — 15	16 — 20	21 — 25	26 — 30	31 — 35	≥ 36	Total
		Positividade								
Precoce	HAP	7	20	3	1	1	—	—	—	32
	SAM	6	6	2	—	1	1	—	1	17
Simultânea		10	55	14	11	6	3	3	1	103
Total		23	81	19	12	8	4	3	2	152

(—) = Não houve pacientes neste intervalo.

Verificou-se que em 103 casos (67,76%) a positividade sorológica ocorreu simultaneamente nas provas de HAP e SAM. Em 32 pacientes (21,05%) a prova de HAP antecipou resultados positivos em relação à SAM, enquanto que em 17 casos (11,18%) a SAM antecipou sorologia positiva.

Aplicando-se o teste de proporções para cada intervalo, encontrou-se que no intervalo de 6 a 10 dias de doença as duas provas não podem ser consideradas iguais, ao nível de significância de 1% com 1 grau de liberdade ($\chi^2 = 6,635$ e $U = 7,475$).

Na tabela 3 estão representadas as médias geométricas dos títulos de anticorpos obtidos nas provas de HAP e SAM em cada intervalo

de dias de doença. Cumpre lembrar que as diluições dos soros foram realizadas somente até 1/4.096 na prova de HAP e 1/12.800 na SAM, devido serem estas diluições utilizadas na rotina laboratorial. Foram analisadas amostras coletadas até o máximo de 35 dias em virtude de não se dispor de número suficiente de soros, após esse período.

Conforme ilustrado nas figuras 1 e 2, verificou-se que houve ascensão dos títulos obtidos na prova de HAP até o intervalo de 11 a 15 dias, tendendo à manutenção ou queda nos períodos subseqüentes. A prova de SAM, por sua vez, apresentou títulos com tendência crescente em todos os intervalos analisados.

TABELA 3

Distribuição da média geométrica dos títulos obtidos nas provas de HAP e SAM em cada intervalo de dias de doença

Intervalo (dias)		1 — 5	6 — 10	11 — 15	16 — 20	21 — 25	26 — 30	31 — 35
Média geométrica dos títulos								
HAP		8,49	253,24	622,21	523,97	490,93	279,17	290,38
SAM		3,98	44,19	120,25	362,90	349,81	1181,45	2058,63

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; VIANNA, T.H.S. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):37-42, 1985.

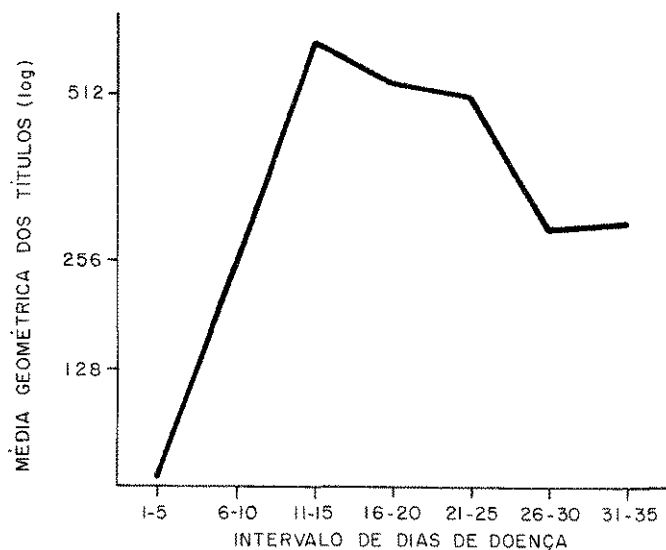


FIGURA 1 — Distribuição das médias geométricas dos títulos de anticorpos obtidos na prova de HAP em intervalos de dias de doença.

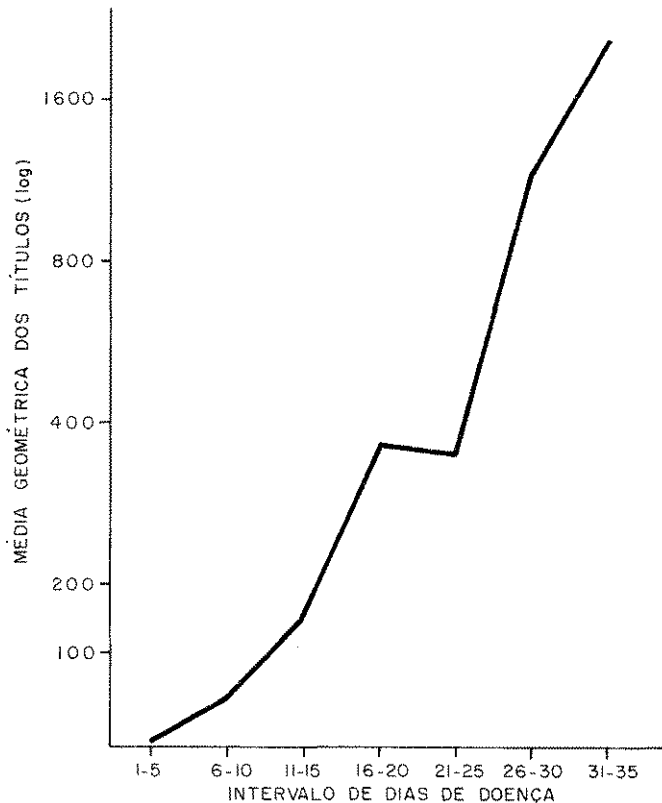


FIGURA 2 — Distribuição das médias geométricas dos títulos de anticorpos obtidos na prova de SAM em intervalos de dias de doença.

DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliando-se a prova de HAP, comparativamente à prova de SAM, encontrou-se alto grau de concordância (88,89%) após seguimento sorológico dos 189 pacientes. Quanto à sensibilidade da HAP, concluiu-se que esta prova detectou corretamente 79,89% dos casos confirmados de leptospirose, valor esse muito próximo ao obtido na prova de SAM (80,42%).

Em investigação inicial⁷, objetivando analisar a prova de HAP, pesquisou-se em 38 pacientes com leptospirose, onde os critérios de positividade para as provas de HAP e SAM foram, respectivamente, títulos ≥ 32 e ≥ 200 . Considerou-se, posteriormente, que os valores então adotados foram muito rigorosos para a prova de SAM e muito abrangentes para a HAP, fatores esses que conferiram à prova de HAP precocidade diagnóstica no período de 2 a 10 dias após o início dos sintomas.

Num segundo estudo⁸ que abrangeu amostras séricas de 192 pacientes, não houve precocidade em nenhuma das provas, possivelmente devido à falta de informações a respeito do tempo decorrido após o início dos sintomas.

A análise dos resultados obtidos na presente investigação permitiu verificar que, no intervalo de 6 a 10 dias, a prova de HAP apresentou número superior de resultados po-

sitivos, estatisticamente significante, quando comparada à SAM. Deste modo, pode-se concluir que a prova de HAP foi a mais indicada para o diagnóstico de infecção leptospirótica nesse intervalo. Outrossim, para os demais intervalos, o valor diagnóstico de ambas as provas sorológicas foram aceitos como iguais. Cumpre informar, entretanto, que o número de exames realizados no período de 6 a 10 dias foi superior aos demais, o que permite supor que com o aumento das amostras nos diferentes intervalos poder-se-ia identificar outros períodos que destacassem o emprego mais adequado de uma das provas.

No acompanhamento sorológico dos pacientes com leptospirose, a prova de HAP demonstrou títulos em manutenção ou declínio já no intervalo de 16 a 35 dias de doença, enquanto nesse período os títulos da SAM tendiam à ascensão. Conclui-se, pois, que os resultados da prova de HAP, aliados aos aspectos clínicos, constituem melhor subsídio, comparativamente à SAM, no estabelecimento da fase evolutiva da doença leptospirótica.

Agradecimentos

Ao Dr. Marcelo Oswaldo Álvares Corrêa, pela orientação e estímulo valiosos na elaboração deste trabalho, e à Dra. Marina Ortolan Pereira, pela manutenção e fornecimento das cêpas de *Leptospira*.

RIALAG/594

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M. & VIANNA, T.H.S. — Passive hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis in some stages of illness. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):37-42, 1985.

ABSTRACT: Passive hemagglutination test was performed in sera from 189 patients suffering from leptospirosis. Sera were distributed into groups according to stages of illness. The results were compared with those obtained from the reference test (microscopic agglutination test). At the sixth to tenth days of illness, the largest number of positive results in the first sample were demonstrated by hemagglutination test, statistically significant at 1% level. The results suggest that passive hemagglutination test can be employed for serological follow-up of the various stages of leptospirosis.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunodiagnosis; passive hemagglutination test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P. — *Étude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence*. Lyon, 1969. 645 p. [Thèse — Institut de Médecine et d'Hygiène Tropicales, Faculté de Médecine de Lyon]
2. BUCK, A.A. & GART, J.J. — Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Amer. J. Epidemiol.*, 83:586-92, 1966.
3. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 52:311-9, 1974.

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; VIANNA, T.H.S. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):37-42, 1985.

4. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Group d'experts de l'OMS. *Problemes actuels des recherches sur la leptospirose*. Moscou, 1966. *Rapport*. Gineve, 1967. (Ser. rapp. techn. n.º 380).
5. RIBEIRO, M.A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; VIANNA, T.H.S. & CAVALCANTE, Z.M.O. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):35-40, 1984.
6. RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:127-33, 1981.
7. RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico de leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:135-43, 1981.
8. SULZER, C.R.; GLOSSER, J.W.; ROGERS, F.; JONES, W.L. & FRIK, M. — Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J. clin. Microbiol.*, 2:218-21, 1975.

Recebido para publicação em 6 de junho de 1984.

VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EM LEITE PASTEURIZADO TIPO B, DISTRIBUÍDO NA CIDADE DE SÃO PAULO, DE 1980 A 1981 *

Walkyria H. LARA **
Heloisa H. C. BARRETO **
Odete N. K. INOMATA **

RIALAG/595

LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):43-52, 1985.

RESUMO: Amostras de três marcas de leite pasteurizado tipo B, comercializadas na cidade de São Paulo, foram analisadas pelo método da cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons, a fim de avaliar os níveis de resíduos de pesticidas organoclorados. Foram coletadas trinta e seis amostras no ano de 1980 e doze em 1981. A finalidade destas análises foi a de verificar o efeito, nos últimos anos, das medidas regulamentares de defensivos agrícolas adotadas em nosso País, sobre os resíduos de pesticidas organoclorados no leite de vaca e também comparar os novos resultados com os obtidos anteriormente, durante os anos de 1971 a 1979. Em 1980, esses valores variaram de 0,02 mg/kg a 0,70 mg/kg e de 0,00 mg/kg a 0,22 mg/kg para HCH total e somatória de DDT, respectivamente. Em 1981 a variação oscilou entre 0,10 mg/kg a 0,33 mg/kg e 0,00 mg/kg a 0,10 mg/kg para HCH total e somatória de DDT, respectivamente. O gráfico das medianas apresentou valores mais altos em 1980 para HCH em relação aos de 1979 e 1981; o mesmo aconteceu para a somatória de DDT, mas apenas na amostra A, representando uma estabilização desses resíduos nas demais amostras. Das amostras analisadas em 1981, 50% revelaram níveis baixos de Dieldrin, percentagem inferior aos 72% do ano anterior. Todos os valores citados foram calculados na gordura do leite.

DESCRIPTORIOS: leite, determinação de resíduos de pesticidas organoclorados; pesticidas organoclorados em leite, resíduos, determinação.

INTRODUÇÃO

Incidentes relativos ao uso de substâncias químicas no meio ambiente freqüentemente ocorrem como resultado das atividades humanas. Tais substâncias químicas, nas quais se incluem os pesticidas, podem passar para os alimentos por acidente, ou durante o manuseio ou processamento.

Como parte de sua responsabilidade para assegurar a saúde pública da população e

sendo o Centro Colaborador do Programa conjunto FAO/OMS para Monitoramento da Contaminação de Alimentos e Rações, no Brasil, o Instituto Adolfo Lutz vem investigando os pesticidas em alimentos, há vários anos, e discutindo os progressos feitos pelo seu uso.

Nestes últimos anos várias medidas de regulamentação têm sido tomadas em nosso País em relação ao uso de pesticidas organo-

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

clorados, visando diminuir, assim, os resíduos desses produtos nos alimentos.

Em 1979, LARA, et alii⁵ determinaram níveis de pesticidas organoclorados, em leite de vaca, para comparação com os obtidos nos levantamentos realizados por ALMEIDA & BARRETTO¹, em 1971.

Com o decréscimo nos níveis de HCH total e o aparecimento de DDT em relação às amostras analisadas em 1971, decidiu-se dar continuidade a esses levantamentos para verificação das tendências desses níveis. Foram coletadas, na cidade de São Paulo, amostras de leite pasteurizado tipo B, das marcas mais populares, durante os anos de 1980 e 1981, que representam parte do leite consumido pela população.

Das diferentes marcas de leite tipo B analisadas em 1979, uma foi extinta do mercado e por isso o estudo foi realizado apenas com as três marcas restantes. O fato de se terem encontrado pequenas variações nos níveis estudados em 1980 e em face da restrição financeira passada pelo laboratório em 1981, iniciou-se a análise de amostras trimestralmente.

MATERIAL E METODO

Amostras de leite pasteurizado tipo B de marcas conhecidas, designadas por A, B e C, foram coletadas mensalmente no comércio de São Paulo, durante o ano de 1980 (36 amostras) e trimestralmente em 1981 (12 amostras).

O método utilizado e as condições analíticas foram descritos por LARA et alii²⁵, com modificação em uma das colunas utilizadas no cromatógrafo a gás. Para a cromatografia em fase gasosa foram utilizados dois aparelhos: o cromatógrafo CG 370 com coluna de vidro espiralada de 1/4 de polegada de diâmetro interno e 6 pés de comprimento, com fase estacionária de 1,5% OV-17 + 1,95% QFI em Chromosorb WHP 100 a 120 mesh e o Cromatógrafo Varian Aerograph 2100-00 com coluna de vidro em U de 1/4 de polegada de diâmetro interno e 6 pés de comprimento com fase estacionária de 2,5% QF-1 + 2,5% DC-200 em Chromosorb WHP 100 a 120 mesh.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 4 reúnem os dados obtidos mensalmente de resíduos de pesticidas organoclorados de janeiro a dezembro de 1980 e trimestralmente em 1981. As tabelas 2, 3, 5 e 6 reúnem os valores de HCH total, somatória de DDT e respectivas medianas.

Nas amostras analisadas foram detectados HCH em 100% (1980 e 1981) pp'DDE em 94,4% (1980) e 91,6% (1981); Dieldrin em 72% (1980) e 50% (1981) e HCB em 91,6% (1981).

Em 1980, os valores variaram de 0,02 a 0,74 mg/kg para HCH total, e de 0,00 a 0,22 mg/kg para somatório de DDT. Em 1981, a variação oscilou de 0,10 a 0,33 mg/kg para HCH total e de 0,00 a 0,10 mg/kg para somatória de DDT.

Os valores das medianas foram mais altos em 1980 para HCH em relação aos de 1979 e 1981, o mesmo acontecendo para a somatória de DDT na amostra A.

Todos os valores foram calculados na gordura do leite para facilidade de comparação com os permitidos pela legislação e com os dados anteriores⁵ calculados na gordura.

Para o cálculo de ingestão de pesticidas organoclorados através do leite, os valores deverão ser recalculados em função dos teores de gordura (cerca de 4%) o que reduzirá esses níveis de resíduo na ordem de 1:25.

Comparando os resultados obtidos em 1980 e 1981 com os de 1979⁵, constata-se o aparecimento de Dieldrin, em níveis baixos, representando uma nova contaminação ambiental, provavelmente devido ao uso de Aldrin, uma vez que o Dieldrin teve seu registro cancelado em 1975⁴. O Aldrin é metabolizado a Dieldrin no organismo animal⁶ e é recomendado para o tratamento de toletes de cana-de-açúcar, aplicação no sulco de plantio e no controle de cupins e formigas³. A presença de HCB é explicada pelo fato de que talvez não tenha sido detectado anteriormente por problemas analíticos, pois a separação de HCB e alfa-HCH não é conseguida em alguns tipos de colunas. Os resultados encontrados demonstram uma alteração no quadro de resíduos de pesticidas organoclorados em leite de vaca no período de 1979 a 1981.

TABELA 1

Resíduos de pesticidas organoclorados mg/kg (ppm) na gordura do leite em 1980

Amostra A

(Continua)

Mês	Porcentagem de gordura	HCB	α -HCH	γ -HCH	β -HCH	pp'DDE	op'DDT	pp'DDD	pp'DDT	Dieldrin
Janeiro	3,7	0,00	0,15	0,03	0,22	0,04	0,00	0,02	0,02	0,01
Fevereiro	3,3	0,00	0,14	0,06	0,12	0,07	0,00	0,09	0,06	0,01
Março	3,4	0,00	0,11	0,05	0,15	0,04	0,00	0,01	0,03	0,00
Abril	3,4	0,00	0,15	0,02	0,19	0,03	0,00	0,01	0,01	0,01
Mai	3,2	0,00	0,13	0,02	0,12	0,05	0,00	0,01	0,01	0,02
Junho	3,4	0,00	0,06	0,01	0,09	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01
Julho	3,1	0,00	0,23	0,01	0,23	0,06	0,00	0,00	0,00	0,03
Agosto	3,7	0,00	0,34	0,01	0,25	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
Setembro	3,4	0,00	0,17	0,01	0,13	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
Outubro	3,4	0,00	0,07	0,01	0,22	0,06	0,00	0,00	0,01	0,00
Novembro	3,1	0,00	0,25	0,05	0,45	0,04	0,00	0,00	0,02	0,04
Dezembro	3,4	0,00	0,08	0,01	0,04	0,08	0,00	0,00	0,01	0,01

LARA, W.H.; BARRETO, H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):43-52, 1985.

Amostra B

(continuação)

Mês	Porcentagem de gordura	HCB	α -HCH	γ -HCH	β -HCH	pp'DDE	op'DDT	pp'DDD	pp'DDT	Dieldrin
Janeiro	3,9	0,00	0,14	0,02	0,02	0,02	0,00	0,03	0,03	0,01
Fevereiro	3,5	0,00	0,07	0,02	0,04	0,03	0,00	0,01	0,01	0,01
Março	3,0	0,00	0,07	0,05	0,06	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01
Abril	3,5	0,00	0,10	0,02	0,07	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01
Mai	3,8	0,00	0,10	0,01	0,07	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02
Junho	3,2	0,00	0,12	0,03	0,11	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
Julho	3,2	0,00	0,22	0,01	0,15	0,01	0,00	0,04	0,01	0,02
Agosto	4,0	0,00	0,20	0,01	0,14	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
Setembro	3,3	0,00	0,20	0,01	0,10	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02
Outubro	3,5	0,00	0,02	0,01	0,16	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Novembro	3,4	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dezembro	3,5	0,00	0,07	0,01	0,15	0,30	0,00	0,02	0,01	0,00

IARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45 (1/2): 43-52, 1985.

Amostra C

(conclusão)

Mês	Porcentagem de gordura	HCB	α -HCH	γ -HCH	β -HCH	pp'DDE	op'DDT	pp'DDD	pp'DDT	Dieldrin
Janeiro	3,0	0,00	0,09	0,01	0,05	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00
Fevereiro	3,0	0,00	0,06	0,06	0,04	0,02	0,00	0,01	0,03	0,01
Março	3,6	0,00	0,08	0,03	0,20	0,04	0,00	0,07	0,01	0,01
Abril	3,4	0,00	0,08	0,02	0,03	0,04	0,00	0,00	0,01	0,01
Maiο	3,3	0,00	0,07	0,03	0,03	0,03	0,00	0,01	0,01	0,01
Junho	3,2	0,00	0,24	0,03	0,27	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Julho	3,2	0,00	0,21	0,01	0,17	0,02	0,00	0,03	0,00	0,03
Agosto	3,4	0,00	0,07	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02
Setembro	3,1	0,00	0,12	0,01	0,12	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02
Outubro	3,1	0,00	0,17	0,01	0,27	0,02	0,00	0,00	0,01	0,04
Novembro	3,2	0,00	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dezembro	3,2	0,00	0,17	0,02	0,07	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01

IARA, W.H.; BARRETO, H.H.G. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45 (1/2): 43-52, 1985.

TABELA 2

Níveis de HCH total, mg/kg (ppm), na gordura do leite em 1980

Amostra	Médiana	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maiο	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
A	0,32	0,40	0,32	0,31	0,35	0,27	0,16	0,47	0,60	0,31	0,03	0,74	0,13
B	0,19	0,18	0,13	0,18	0,19	0,18	0,26	0,38	0,35	0,31	0,19	0,02	0,23
C	0,21	0,15	0,16	0,31	0,13	0,13	0,54	0,39	0,09	0,25	0,45	0,09	0,26

TABELA 3

Níveis de Σ DDT, mg/kg (ppm), na gordura do leite em 1980

Amostra	Médiana	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maiο	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
A	0,07	0,08	0,22	0,08	0,05	0,07	0,03	0,06	0,02	0,02	0,07	0,06	0,09
B	0,04	0,08	0,05	0,04	0,04	0,03	0,01	0,06	0,02	0,03	0,01	0,00	0,06
C	0,04	0,04	0,06	0,12	0,05	0,05	0,01	0,05	0,02	0,03	0,03	0,00	0,04

LARA, W.H.; BARRETO, H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45 (1/2): 43-52, 1985.

TABELA 4

Resíduos de pesticidas organoclorados, mg/kg(ppm), na gordura do leite em 1981

Amostra A

Trimestre	% Gordura	HCB	α -HCH	γ -HCH	β -HCH	pp'DDE	op'DDT	pp'DDD	pp'DDT	Dieldrin
1.º	4,3	0,01	0,12	0,02	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,04
2.º	4,0	0,01	0,06	0,02	0,03	0,03	0,00	0,01	0,01	0,00
3.º	3,5	0,03	0,05	0,04	0,05	0,05	0,01	0,01	0,00	0,00
4.º	2,9	0,01	0,26	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02

Amostra B

1.º	4,3	0,01	0,07	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
2.º	4,1	0,02	0,23	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03
3.º	3,6	0,01	0,11	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4.º	3,3	0,04	0,08	0,04	0,02	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00

Amostra C

1.º	3,6	0,01	0,14	0,01	0,03	0,02	0,00	0,01	0,01	0,02
2.º	3,3	0,01	0,30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
3.º	2,6	0,03	0,09	0,06	0,05	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
4.º	3,6	0,00	0,06	0,04	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00

LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45 (1/2): 43-52, 1985.

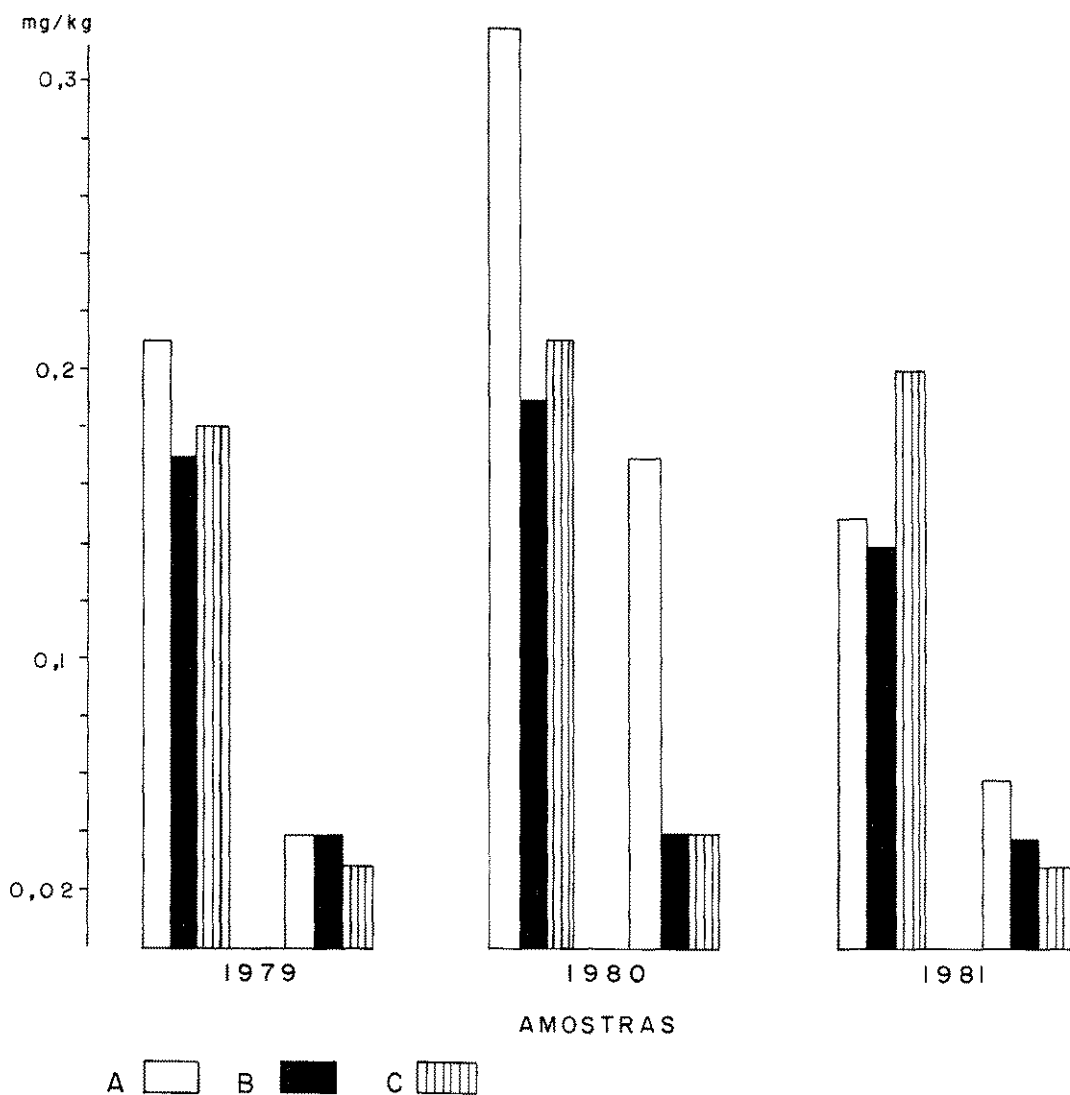


FIGURA — Medianas de HCH total e Σ DDT, nas três marcas de leite analisadas, durante os anos de 1979, 1980 e 1981.

LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):43-52, 1985.

TABELA 5

Níveis de HCH total, mg/kg(ppm), na gordura do leite em 1981

Amostra	Mediana	1.º Trimestre	2.º Trimestre	3.º Trimestre	4.º Trimestre
A	0,15	0,16	0,11	0,14	0,33
B	0,14	0,10	0,27	0,13	0,14
C	0,20	0,18	0,32	0,20	0,13

TABELA 6

Níveis de Σ DDT, mg/kg(ppm), na gordura do leite em 1981

Amostra	Mediana	1.º Trimestre	2.º Trimestre	3.º Trimestre	4.º Trimestre
A	0,06	0,04	0,10	0,07	0,04
B	0,04	0,04	0,04	0,00	0,05
C	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02

CONCLUSÃO

Apesar da falta de continuidade decorrente da carência de recursos no monitoramento dos níveis de organoclorados em leite, é de grande

importância este tipo de controle pois, além de novos fatos serem detectados, pode-se avaliar, assim, o efeito da legislação sobre o uso dos organoclorados nos anos futuros.

RIALAG/595

LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Levels of organochlorine pesticide residues in pasteurized milk sold in São Paulo City between 1980 and 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):43-52, 1985.

ABSTRACT: Samples of three commercial brands of grade B pasteurized milk were collected in São Paulo city, of which 36 were collected in 1980 and 12 in 1981. All samples were tested for the presence of residues of organochlorinated pesticides by using gas-liquid chromatography with electron-capture detector. The levels of residual pesticides ranged from 0.02 mg/kg to 0.70 mg/kg for total HCH and from 0.00 to 0.22 mg/kg for DDT summation. In 1981, the ranges were 0.10 to 0.33 mg/kg for total HCH and 0.00 to 0.10 mg/kg for DDT summation. The plot of medians showed higher values for HCH in 1980 compared with 1981 and the previously reported values for 1979. Low levels of Dieldrin were detected in 72% of the 1980 samples and in 50% of the 1981 samples. All values were calculated in milk fat.

DESCRIPTORS: milk, determination of organochlorine pesticide residues; organochlorine pesticide residues in milk, determination.

LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):43-52, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W. & BARRETO, H.H.C. — Resíduos de pesticidas clorados em leite consumido em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:13-20, 1971.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12nd ed. Washington, AOAC, 1975. p. 523 (seção 29.012c).
3. BRASIL. Leis, decretos etc. — Portaria Gab/SNVS n.º 22, de 18 de maio de 1984, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial*, Brasília, 22 de maio 1984. Seção I, p. 7228-72. Atribui à DINAL a compilação da relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas... e dá a relação de substâncias com ação tóxica sobre animais e plantas...
4. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Catálogo dos defensivos agrícolas*. 2.^a ed. Brasília, 1980. 147 p.
5. LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de pesticidas organoclorados em leite consumido na cidade de São Paulo em 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:65-73, 1980.
6. MATSUMURA, F. — *Toxicology of insecticides*. New York, Plenum press, 1975. p. 60, 198.

Recebido para publicação em 6 de junho de 1984.

FREQÜÊNCIA DE ANTICORPOS PARA OS VÍRUS DA INFLUENZA TIPOS A E B, EM HABITANTES DA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL, EM 1982 *

Maria Akiko ISHIDA **
Shunji SAKAKIBARA ***
Yoko YOKOTA ***
Asao YAMAGUCHI ***

RIALA6/596

ISHIDA, M.A.; SAKAKIBARA, S.; YOKOTA, Y. & YAMAGUCHI, A. — Freqüência de anticorpos para os vírus da influenza tipos A e B em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, em 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):53-59, 1985.

RESUMO: Em fevereiro de 1982, foram colhidos 180 soros de 180 habitantes da cidade de São Paulo, de diferentes grupos etários, e realizadas titulações de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus da influenza tipos A e B. Os resultados obtidos com a estirpe A/Swine/Iowa/15/30 (H_1N_1) em pessoas do grupo etário acima de 60 anos, e A/PR/8/34 (H_1N_1), no grupo etário de 40 a 49 anos, revelaram percentagem elevada de soros positivos, determinados por infecção primária anterior por estes vírus ou variantes. Nos resultados obtidos com a estirpe A/Kumamoto/37/79 (H_1N_1), a elevada percentagem de soros positivos foi observada em habitantes dos grupos etários de 10 a 19 anos e 40 a 49 anos, indicando que cada grupo sofreu infecção primária pelo subtipo H_1N_1 em 1977 e de 1947 a 1957, respectivamente. O vírus antigenicamente relacionado ao subtipo H_2N_2 não circulou na população estudada desde a sua última pandemia ocorrida em 1957. Quanto à positividade de soros para os subtipos H_3N_2 , A/Bangkok/1/79 (H_3N_2) e A/Shiga/114/82 (H_3N_2) esta se deveu provavelmente às reações cruzadas entre as variantes antigênicas desse subtipo (H_3N_2). A variante de influenza antigenicamente relacionada a B/Shiga/1/71 e B/Kanagawa/3/76 circulou em São Paulo nestes últimos anos. Porém, os resultados obtidos com a estirpe B/Shiga/75/81 demonstraram percentagens de soros positivos e médias geométricas baixas, significando que nenhuma variante relacionada a essa estirpe, até o momento, circulou nesta população.

DESCRITORES: vírus da influenza, tipos A, B; anticorpos contra o vírus da influenza, freqüência em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, 1982.

INTRODUÇÃO

O vírus da influenza, responsável por infecção respiratória no homem, causa infecções esporádicas durante o decorrer do ano, geralmente no inverno. Apresenta-se na forma de surtos epidêmicos e, eventualmente, pandêmicos. São conhecidos três tipos imunologicamente distintos do vírus: o vírus da influenza tipo A, que além de infecção humana pode causar infecção nos animais, e os tipos B e C, que só causam infecções humanas.

Nas epidemias causadas pelo vírus da influenza A em seres humanos, alta inci-

dência é encontrada no grupo etário de 5 a 14 anos, sendo mais freqüente no grupo etário de 5 a 9 anos de idade. Em relação ao vírus da influenza tipo B, sua incidência é semelhante à verificada para o vírus tipo A, porém, o vírus tipo B destaca-se por causar surtos localizados, principalmente em crianças de idade escolar e, esporadicamente, em adultos¹⁰. Já o vírus da influenza tipo C raramente causa epidemias.

É historicamente constatado que a epidemia da gripe espanhola, ocorrida durante os anos 1918 a 1919, foi causada pelo subtipo H_1N_1 que circulou até 1933. Em seguida, outra epidemia, causada por outro subtipo, predominou

* Realizado no Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, Japão.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

*** Do Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, Japão.

entre os anos 1934 a 1946 e, posteriormente, a epidemia da gripe italiana, causada ainda por outro subtipo H_1N_1 , grassou durante os anos de 1947 a 1956. No ano de 1957 surgiu um novo subtipo, o H_2N_2 , causando a pandemia denominada gripe asiática, que circulou até 1967. Em 1968, surgiu outra pandemia causada agora pelo subtipo H_3N_2 , que até o momento tem circulado com formas de novas variantes por todo o mundo. No ano de 1977, foi registrada a epidemia da gripe russa^{10, 11}, causada pelo reaparecimento do subtipo H_1N_1 . Os subtipos H_1N_1 e H_2N_2 continuam em circulação na população mundial, causando epidemias em formas de novas variantes antigênicas^{6, 8, 13}.

No Brasil, PEREIRA et alii⁵ verificaram que a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus da influenza em soros de índios do Xingu, colhidos em 1966 e 1967, foi sensivelmente mais baixa que nas populações civilizadas. Em soros colhidos em 1969, estes autores obtiveram uma percentagem de 72,8% de soros positivos com títulos elevados e média geométrica igual a 35,2% para a variante A/SP/101/68 (H_2N_2), mostrando claramente a infecção desta população indígena por esta estirpe.

Em 1967, CANDEIAS & PEREIRA² estudaram a intensidade da ação da variante A/Hong Kong/68 (H_2N_2) sobre a população da cidade de São Paulo, Brasil, verificando que três quartos da população adulta adquiriram a infecção algum tempo após o aparecimento da variante, sendo que a maioria destes foi infectada no primeiro ano de prevalência deste vírus.

No ano de 1975, ANRAKU et alii¹ estudaram a circulação dos vírus de influenza na população infantil das cidades de São Paulo e Mogi das Cruzes (Brasil), concluindo que a variante A/Engl/42/72 (H_2N_2) era a que estava circulando com maior intensidade na época.

Em 1976, TAKIMOTO et alii¹², estudando a freqüência de anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, verificaram que as pessoas nascidas antes do ano de 1926 possuíam anticorpos na proporção de 63,3% para A/Swine/Wisconsin/1/67 (H_1N_1) e 87% para A/Mayo Clinic/103/74 (H_1N_1). Foi verificado, também, que cerca de 42% da população apresentava anticorpos para (A/SP/2/76 (H_2N_2), responsável pelo surto epidêmico da influenza ocorrido naquele ano.

No ano de 1982, CHAVES & NASCIMENTO³ determinaram anticorpos para três amostras de vírus da influenza A em soros coletados no Rio de Janeiro, entre os anos de 1976 a 1980. Verificaram que anticorpos para A/Victoria/3/75 (H_2N_2) foram encontrados em maior proporção, durante 1976, um

ano após o seu aparecimento em nosso meio. A freqüência da detecção de anticorpos para A/Texas/1/77 (H_2N_2) foi muito baixa, havendo pouca evidência de que este vírus tenha circulado amplamente. Anticorpos para A/USSR/90/77 (H_1N_1) estavam ausentes em soros de pessoas no grupo etário de 20 anos em 1976 e 1977.

Este trabalho objetivou determinar a resposta imunológica da população de São Paulo, em relação ao vírus da influenza tipo A e tipo B.

MATERIAL E MÉTODOS

Em fevereiro de 1982, foram colhidos, ao acaso, na Seção de Colheita de Material do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 180 soros de 180 indivíduos de diferentes grupos etários, residentes na cidade de São Paulo. Estes não apresentavam sinais ou sintomas de quadro clínico respiratório e recorreram à Instituição para realizar exames laboratoriais diversos. As amostras de soros foram separadas em oito diferentes grupos etários: 0 a 4, 5 a 9, 10 a 19, 20 a 29, 30 a 39, 40 a 49, 50 a 59 e indivíduos acima de 60 anos. O número de soros para cada grupo foi respectivamente 11; 15; 25; 28; 26; 25; 32 e 18. A proporção geral de homens para mulheres na amostra foi de 1:2,4. As amostras colhidas no Instituto Adolfo Lutz foram enviadas ao Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, Japão, para serem estudadas.

As soluções diluentes utilizadas foram: solução de NaCl a 0,85% para lavar e suspender as hemácias de galinha, e solução tamponada por veronal (VBS) com 2% de albumina bovina (fração V)*, mais 0,5% de gelatina** a 1% para diluir os soros e os antígenos.

As hemácias de galinha sempre foram colhidas no mesmo dia em que se realizou a reação, sendo lavadas no mínimo três vezes com solução NaCl a 0,85%. A suspensão a 4% foi padronizada pelo método da cianomet-hemoglobina⁴.

Os antígenos utilizados foram: A/Swine/Iowa/15/30 (H_1N_1); A/PR/8/34 (H_1N_1); A/Kumamoto/37/79 (H_1N_1); A/Adachi/5/57 (H_2N_2); A/Bangkok/1/79 (H_2N_2) e B/Kanagawa/3/76***. Além destes antígenos, utilizaram-se A/Shiga//114/82 (H_2N_2), B/Shiga/1/71 e B/Shiga//75/81, que foram isolados e produzidos no Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga (Japão). Esses últimos antígenos por nós preparados no Japão foram produzidos na cavidade alantóide de ovos embrionados. Os líquidos

* Reheis Chemical Company, Kankakee, Ill., USA.

** DIFCO, Detroit, Michigan, USA.

*** Denka Institute of Biological Science, Tokyo, Japan.

alantóicos colhidos foram concentrados a 20.000 rpm, inativados com formalina a 10% e estabilizados com glicerina a 10%. Todos os antígenos foram guardados a 4°C e sempre titulados no dia da realização do teste para a determinação de 4 unidades hemaglutinantes de antígeno (UHA) em 0,025 ml.

Reação de inibição de hemaglutinação

Os soros foram tratados com "Receptor destroying enzyme" (RDE) * a fim de retirar os inibidores inespecíficos encontrados nos soros humanos. A cada volume do soro a ser tratado foram adicionados três volumes de RDE (100 unidades de RDE por ml), que, em seguida foram incubados em estufa a temperatura de 37°C, por uma noite. No dia seguinte, o soro tratado foi inativado em banho-maria a 56°C, por uma hora e, em seguida, foi adicionado a ele uma gota de papa de hemácias de galinha. Após agitação vigorosa, foi colocado em banho de gelo a 4°C, pelo período de 15 minutos. Finalmente, o soro foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado como soro diluído a 1:4.

A reação de inibição de hemaglutinação foi realizada em microplacas permanentes com fundo em U. Os soros foram diluídos com tampão VBS e as diluições feitas a partir de 1:4 até 1:512 no volume de 0,025 ml com o aparelho de diluição automática **. Aos soros diluídos nas microplacas foram adicionados 0,025 ml de antígeno de influenza contendo 4 UHA/0,025 ml. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por uma hora e, em seguida, nela colocados 0,05 ml de suspensão de hemácias a 0,4%. Após agitação das placas e incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura depois de uma hora. Foram realizados simultaneamente o controle do soro diluído a 1:4 e controle da suspensão de hemácias a 0,4%. A diluição inicial do soro foi considerada 1:16, pois a ele foram adicionados 0,025 ml de antígeno e 0,05 ml da suspensão de hemácias. O título de anticorpos inibidores de hemaglutinação foi definido como a última diluição do soro que inibiu completamente a atividade hemaglutinante do antígeno. Com as titulações dos anticorpos inibidores de hemaglutinação para os vírus da influenza tipos A e B em soros de indivíduos de diferentes grupos etários, calculou-se a percentagem de soros positivos a partir do título igual ou maior que 16 e, paralelamente, a partir de igual ou maior que 64.

RESULTADOS

As percentagens de soros positivos para os vírus da influenza tipos A e B, e a média geométrica dos títulos de anticorpos, estão

representadas nas figuras 1 e 2 das páginas 56 e 57.

Em relação à estirpe A/Swine/Iowa/15/30 (H₁N₁), o grupo etário de indivíduos acima de 60 anos apresentou 88,9% (2^{7.2}) *** de soros positivos. No grupo etário de 50 a 59 anos a percentagem foi menor que 16%.

Com a estirpe A/PR/8/34 (H₁N₁) obtiveram-se, nos indivíduos acima de 40 anos, 94,4% (2^{5.9}) a 100% (2^{7.2}) de soros positivos e, nos grupos etários abaixo de 39 anos, às percentagens observadas foram menores que 38,4%.

Os resultados com a estirpe A/Kumamoto/37/79 (H₁N₁) revelaram que em todos os grupos etários as percentagens de soros positivos foram acima de 53,3%, sendo que, nos grupos etários de 10 a 19, 30 a 39 e 40 a 49 anos de idade, as percentagens foram mais elevadas, isto é, 92% (2⁷), 92,3% (2^{6.4}) e 100% (2⁷), respectivamente.

Quando usamos a estirpe A/Adachi/5/57 (H₂N₂), os resultados obtidos em indivíduos com idade acima de 20 anos apresentaram percentagens elevadas de soros positivos, variando entre 93,8% (2^{8.5}) e 100% (2^{8.8}). No grupo etário de 10 a 19 anos a percentagem foi de 60% (2^{6.6}) e, em crianças abaixo de 9 anos, a percentagem foi de 13,3% (2⁴).

Com a estirpe A/Bangkok/1/79 (H₂N₂) observamos que todos os grupos etários demonstraram elevadas percentagens de soros positivos entre 81,8% (2^{5.4}) e 100% (2^{6.4}). Entretanto, os resultados com a variante recentemente isolada em Shiga (Japão), denominada A/Shiga/144/82 (H₂N₂), revelaram que nos indivíduos pertencentes aos grupos etários de 10 a 59 anos as percentagens obtidas foram baixas, isto é, entre 50% (2^{4.9}) e 70,8% (2^{5.8}). Em crianças com idade abaixo de 9 anos e, em adultos acima de 60 anos, as percentagens obtidas com esta estirpe foram 26,3% (2^{7.5}) e 39,1% (2^{6.8}), respectivamente. As percentagens de soros positivos para a estirpe A/Shiga/114/82 (H₂N₂) em todos os grupos etários foram menores que as apresentadas pela estirpe A/Bangkok/1/79 (H₂N₂), ainda que as médias geométricas dos títulos de anticorpos sejam elevadas com estes dois antígenos.

Os resultados obtidos com as estirpes do vírus da influenza tipo B constataram que, com o antígeno B/Shiga/1/71, os indivíduos dos grupos etários entre 10 e 39 anos e acima de 60 anos apresentaram percentagens de soros positivos que variaram entre 61,5% (2^{4.7}) a 89,3% (2^{5.9}). Em outros grupos etários, de 0 a 9 anos e 40 a 49 anos, as percentagens obtidas com este antígeno ficaram entre 0 e 32% (2^{5.4}). Por outro lado, com a estirpe do vírus B/Kanagawa/3/76 os resultados revelaram que os indivíduos com idade

* Takeda Pharmaceutical Company LTD., Osaka, Japan.

** Cooke Engineering Company, San Mateo, Califórnia.

*** Média geométrica indicada entre parênteses.

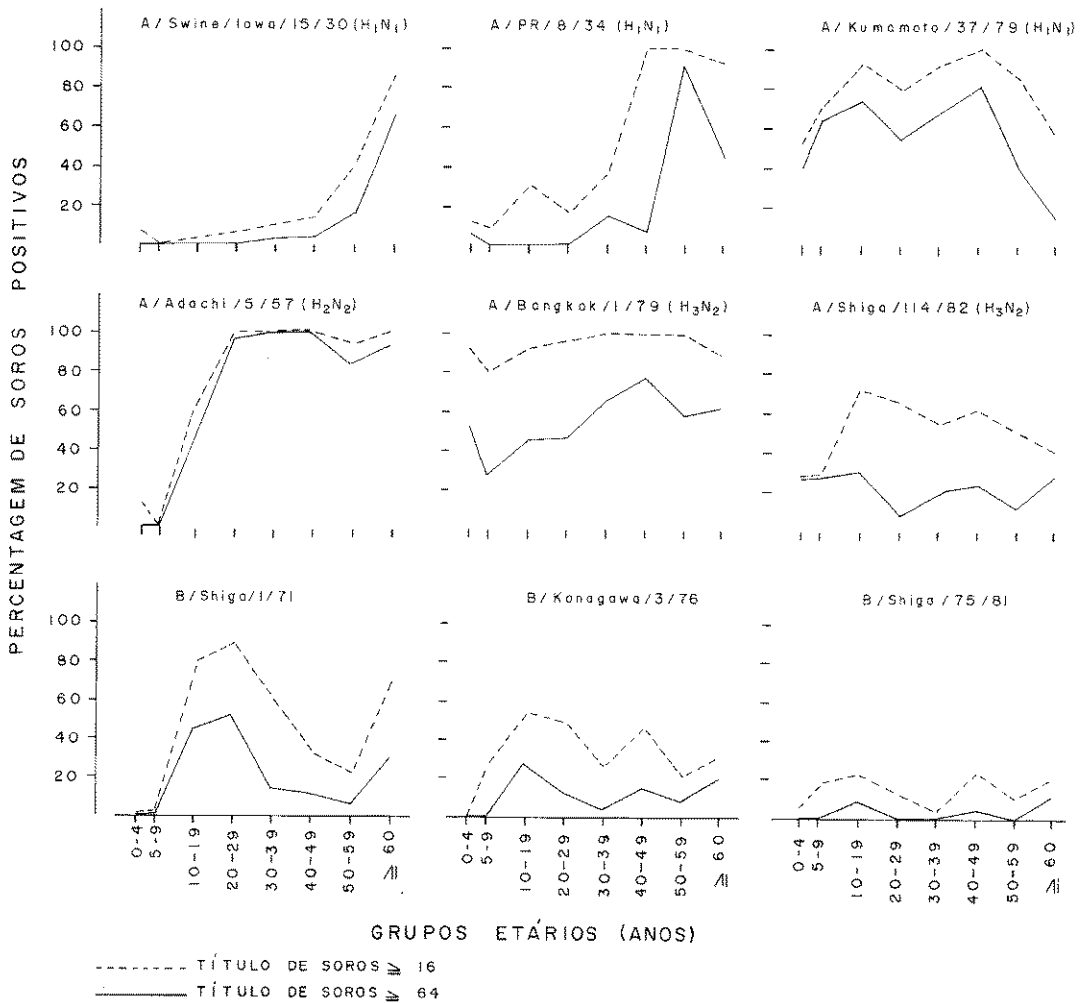


FIGURA 1 — Percentagem de soros positivos para vírus de influenza tipos A(H₁N₁), A(H₂N₂), A(H₃N₂) e tipo B em indivíduos de diferentes grupos etários da cidade de São Paulo, Brasil, 1982.

acima de 5 anos exibiram percentagens de soros positivos que variaram entre 21,9% (2^{5,1}) e 55% (2^{5,4}), percentagem menor que a apresentada com a estirpe anterior. Os resultados em relação à estirpe B/Shiga/75/81 revelaram que todos os soros testados apresentaram percentagens abaixo de 24% (2^{4,7}).

Os resultados obtidos nas reações de inibição de hemaglutinação, quando consideramos os soros positivos com títulos igual ou maior que 64, apresentaram, de modo geral, paralelismo aos obtidos quando consideramos os soros positivos com título igual ou maior que 16. Este paralelismo foi evidente na maioria das estirpes de vírus da influenza tipos

A e B usados, não sendo, entretanto, evidente quando os títulos dos soros testados foram baixos.

DISCUSSÃO

Nossos resultados constatarem que em pessoas com idade acima de 60 anos, nascidas antes do ano de 1922, a percentagem de soros positivos para a estirpe A/Swine/Iowa/15/30 (H₁N₁) foi de 88,9% (2^{7,2}), achados esses semelhantes aos anteriormente relatados por TAKIMOTO et alii¹² com estirpes relacionadas.

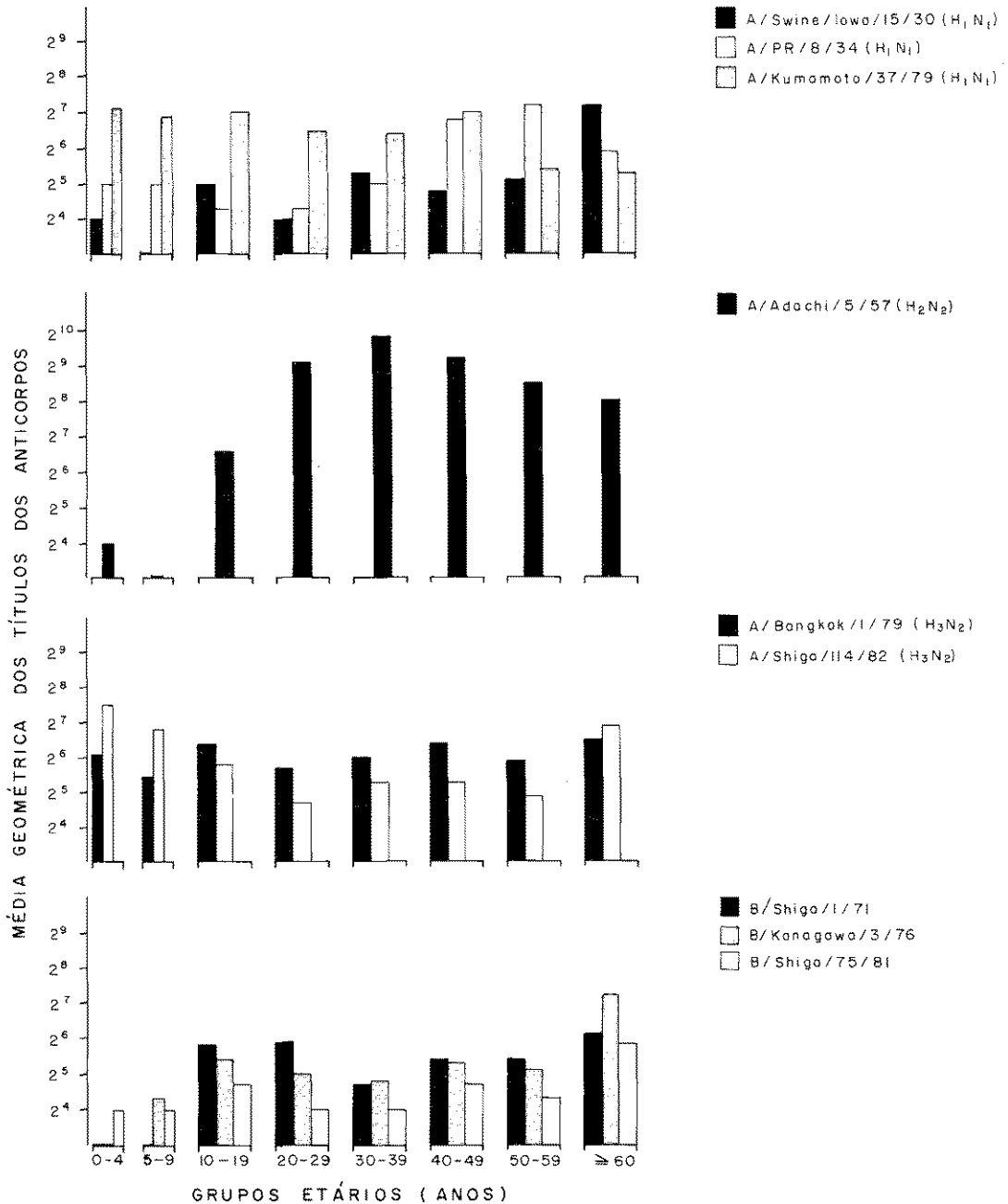


FIGURA 2 — Média geométrica dos títulos dos anticorpos hemaglutinantes para vírus de influenza tipos A e B em indivíduos de diferentes grupos etários da cidade de São Paulo, Brasil, 1982.

A alta percentagem de soros positivos encontrada nos grupos etários de 40 a 49 e 50 a 59 anos (100%) frente à estirpe A/PR/8/34 (H₁N₁) significa que todas as pessoas desta população estudada adquiriram a infecção na sua infância por ocasião da epidemia desta estirpe.

Estudos realizados em São Paulo por TAKIMOTO et alii¹³, durante os anos de 1976 a 1978, mostraram que houve o retorno do subtipo H₁N₁ que circulou nos anos 1947 a 1957, porém, o vírus recém-isolado A/Br/11/78 (H₁N₁) revelou-se diferente do protótipo A/FM/1/47 (H₁N₁) e da estirpe A/USSR/90/77 (H₁N₁) que prevaleceu em outros países na mesma época.

A estirpe A/Kumamoto/37/79 (H₁N₁), utilizada neste trabalho, isolada no Japão, apresenta pequena variação antigênica em relação às estirpes A/Br/11/78 (H₁N₁) e A/USSR/90/77 (H₁N₁)¹¹. Os soros de indivíduos dos grupos etários de 10 a 19 e 40 a 49 anos apresentaram percentagens elevadas de soros positivos para a estirpe A/Kumamoto/37/79 (H₁N₁) e a média geométrica dos títulos de anticorpos foram elevadas em todos os grupos etários, demonstrando que os indivíduos destes grupos responderam com títulos elevados de anticorpos aos diferentes vírus da infecção primária do subtipo H₁N₁. Isto é, indivíduos de 10 a 19 anos infectaram-se quando houve o reaparecimento deste subtipo no ano de 1977 e os do grupo etário de 40 a 49 anos adquiriram a infecção durante a epidemia iniciada no ano de 1947. As elevadas médias geométricas encontradas em todas as idades demonstram claramente que este subtipo continua circulando na população.

Os resultados obtidos com a estirpe A/Adachi/5/57 (H₂N₂) revelaram que as percentagens de soros positivos encontradas foram elevadas (60 a 100%), assim como as médias geométricas dos títulos dos anticorpos (2^{5.6} a 2^{9.3}) nos indivíduos acima de 10 anos, correspondendo às pessoas que adquiriram a infecção durante a pandemia por este subtipo, no ano de 1957. Na figura 1, considerando as percentagens dos indivíduos com soros positivos de títulos igual ou acima de 64, podemos observar claramente que este subtipo não prevaleceu mais na população desde a sua última pandemia.

No ano de 1968, surgiu o subtipo H₂N₂, que causou a pandemia da gripe chamada Hong Kong e, desde então, semelhantemente ao que acontece com o subtipo H₁N₁, o subtipo H₂N₂ continua circulando em formas de novas variantes antigênicas, em diversas populações^{6, 7, 10, 13}.

Já na cidade de São Paulo, no ano de 1976, ocorreu um surto de influenza de proporções consideráveis, causado por vírus antigenicamente relacionado ao A/Victoria/3/75 (H₂N₂),

enquanto que, em 1977, os vírus isolados foram em sua maioria semelhantes ao A/Texas/1/77 (H₂N₂), mas a estirpe do ano anterior ainda foi prevalente na população¹³. Neste sentido, vale salientar que SMITH & DAVIES⁹ estudaram as respostas para o antígeno hemaglutinina e neuraminidase do vírus da influenza tipo A (H₂N₂), num período de quatro anos e verificaram que as estirpes do subtipo H₂N₂ apresentavam reações cruzadas com as variantes antigênicas anteriores.

Os resultados obtidos com a estirpe A/Bangkok/1/79 (H₂N₂) demonstraram que todos os indivíduos possuíam altas percentagens de soros positivos (81,9 a 100%) e a média geométrica dos títulos de anticorpos foram relativamente elevadas (2^{5.4} a 2^{6.5}). Este fato provavelmente ocorreu pela reação entre as outras variantes do mesmo subtipo que circularam nesta população. Em relação à estirpe A/Shiga/114/82 (H₂N₂) as percentagens de soros positivos foram menores do que as encontradas frente ao A/Bangkok/1/79 (H₂N₂) e, quando foram consideradas as percentagens de soros positivos de título igual ou acima de 64 para A/Shiga/114/82, essas percentagens foram bem menores, sugerindo que nenhum vírus antigenicamente relacionado circulou na cidade de São Paulo.

Os resultados obtidos para a estirpe B/Shiga/1/71 mostraram percentagens de soros positivos ligeiramente mais elevadas que para o B/Kanagawa/3/76, porém, as médias geométricas ligeiramente altas para os dois vírus foram semelhantes, sugerindo que alguma variante antigenicamente relacionada circulou na cidade de São Paulo. Para a estirpe B/Shiga/75/81 a percentagem de soros positivos foi abaixo de 24% e a média geométrica também baixa, significando que nenhuma variante relacionada a essa estirpe, até o momento, circulou nesta população.

Nossos dados, mostrando as percentagens de indivíduos imunes e/ou susceptíveis ao vírus da influenza tipos A e B em habitantes da cidade de São Paulo, constituem-se em mais uma contribuição ao sistema de vigilância epidemiológica destas infecções, principalmente orientando as medidas sanitárias cabíveis durante a ocorrência de surtos e/ou epidemias.

Agradecimentos

Ao Governo da Província de Shiga, Japão, por ter oferecido a bolsa de estudo; ao Dr. Bun-iti Nakagawa, diretor do Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, Japão, onde foi realizado este trabalho e à Seção de Colheita de Material do Instituto Adolfo Lutz, por ter colaborado na colheita das amostras de sangue.

ISHIDA, M.A.; SAKAKIBARA, S.; YOKOTA, Y. & YAMAGUCHI, A. — Frequência de anticorpos para os vírus da influenza tipos A e B, em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, em 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):53-59, 1985.

RIALA6/596

ISHIDA, M.A.; SAKAKIBARA, S.; YOKOTA, Y. & YAMAGUCHI, A. — Frequency of antibodies against type A and type B influenza virus in inhabitants of São Paulo City, Brazil, in 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):53-59, 1985.

ABSTRACT: The hemagglutination-inhibiting antibodies against type A and type B influenza viruses were tested in 180 sera from 180 persons of various age groups of inhabitants of São Paulo City. The specimens were collected in February 1982. The high percent of positives sera against strains A/Swine/Iowa/15/30 (H₁N₁) in persons over 60 year old, and A/PR/8/34 (H₁N₁) in persons 40 to 49 year old showed that the persons were infected by this virus or variants when they were children. The results with the strain A/Kumamoto/37/79 (H₁N₁) showed that the sera of persons 10 to 19 and 40 to 49 year old replayed in high percent of positives sera against the subtype H₂N₂, from the primary infection in 1977 and 1947-1957 respectively. Subtype H₂N₂ had not circulated in this population since the last pandemic in 1957. The strain A/Bangkok/1/79 (H₂N₂) and A/Shiga/114/82 (H₂N₂) showed high percent of positives sera in all age groups, probably because of cross reaction among other antigenic variants of subtype H₂N₂. A strain of influenza related to B/Shiga/1/71 and B/Kanagawa/3/76 circulated in São Paulo but the infection by strain B/Shiga/75/81 was not disclosed in the population studied because both the percentages of positives sera and geometric mean of titers were slow in all age groups.

DESCRIPTORS: influenza virus, types A, B; antibodies against influenza virus, frequency in inhabitants of São Paulo City, Brazil, 1982.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANRAKU, M.M.C.; GODOY, C.V.F.; COSTA, G.A.; KIMURA, E.M.; KAMIYAMA, M.Y. & FONSECA, M.H.M. — Circulação dos vírus da influenza tipos A e B, em amstras de população infantil das cidades de São Paulo e Mogi das Cruzes. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 16:94-8, 1977.
2. CANDEIAS, J.A.N. & PEREIRA, M.S. — The measurent by serological means of the impact of the Hong Kong/68 Influenza virus on a population. *Rev. Saúde pública*, 6:85-8, 1972.
3. CHAVES, J.R.S. & NASCIMENTO, J.P. — Influenza surveillance in Rio de Janeiro: a serological study. *Rev. Microbiol.*, 13: 161-5, 1982.
4. PALMER, D.F.; COLEMAN, M.T.; DOWDLE, W.R. SCHILD, G.C. — *Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis*. Atlanta, Georgia, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, 1975. p. 25-62.
5. PEREIRA, H.G.; BARUZZI, R.G. & CARVALHO, R.P.S. — Estudo de anticorpos contra os vírus da influenza em índios do Alto Xingu (Brasil Central). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 13:285-91, 1971.
6. PEREIRA, M.S.; ASSAAD, F.A. & DELON, P.J. — Influenza surveillance. *Bull. WHO*, 56:193-203, 1978.
7. SAKAKIBARA, S. — Epidemic of influenza in Shiga Prefecture (1973-1975). *Rep. Shiga Pref. Inst. Pub. Hlth. & Environ. Sci.*, 10:22-8, 1974.
8. SAKAKIBARA, S. & YOKOTA, Y. — Epidemic of influenza in Shiga Prefecture (1980). *Rep. Shiga Pref. Inst. Pub. Hlth. & Environ. Sci.*, 15:95-9, 1980.
9. SMITH, A.J. & DAVIES, J.R. — Natural infection with influenza A(H₂N₂). The development, persistence and effect of antibodies to the surface antigens. *J. Hyg., Camb.*, 77:271-82, 1976.
10. STUART-HARRIS, C.H. & SCHILD, G.C. — *Influenza. The viruses and disease*. London, Edward Arnold, 1976. p. 112-43.
11. TAKEUCHI, Y. — Variação antigênica do vírus da influenza e o efeito preventivo da vacina. In: FUKUMI, H., ed. — *Vaccines against influenza*. Tokyo, Igaku Shoin, 1982. p. 36-86.
12. TAKIMOTO, S.; BARBOSA, H.H.G. & SALLES-GOMES, L.F. — Influenza suína: Frequência de anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:71-5, 1978.
13. TAKIMOTO, S.; PANNUTI, C.S.; SALLES-GOMES, L.F.; BARBOSA, H.H.G.; MORAES, V.C.M. & HIGUCHI, A.E.C. — Influenza em São Paulo, durante os anos 1976-1978. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 24:49-55, 1982.

Recebido para publicação em 7 de março de 1985.

VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICAS DE BISCOITOS POR MICROSCOPIA *

Claydes de Quadros ZAMBONI **
Mônica Arcon BATISTIC **

RIALA6/597

ZAMBONI, C.Q. & BATISTIC, M.A. — Verificação das condições higiênicas de biscoitos por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):61-64, 1985.

RESUMO: Foram analisadas pelo método da digestão com pancreatina, 109 amostras de biscoitos adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, sendo 57 do tipo "Cream-Cracker" e 52 do tipo "Maizena". Chegou-se à conclusão que 100% dos biscoitos "Cream-Cracker" estavam em condições higiênicas insatisfatórias, contaminados com fragmentos de insetos, sendo 3,5% impróprios para o consumo por conterem pêlos de roedores e que 96,15% dos biscoitos "Maizena" estavam em condições higiênicas insatisfatórias, sendo 5,77% impróprios para o consumo pelos mesmos motivos que os do tipo "Cream-Cracker".

DESCRITORES: biscoitos "Cream-Cracker", "Maizena", análise microscópica de impurezas.

INTRODUÇÃO

A matéria-prima e os produtos de panificação como pães, biscoitos etc., podem ser contaminados por sujidades no campo, na armazenagem, na indústria e nos moinhos.

Em trabalhos anteriores^{1, 2} verificamos a presença de material estranho em farinhas de rosca e trigo, através da extração, concentração, identificação e quantificação de sujidades leves e pesadas.

Aventamos a hipótese de que, do mesmo modo que as farinhas de trigo e rosca, os biscoitos também poderiam estar contaminados com sujidades. Idealizamos, portanto, o presente trabalho, com a finalidade de verificar as condições de higiene de dois tipos de biscoitos, que são, na nossa opinião, os mais comumente consumidos pela população infantil.

A finalidade deste trabalho foi verificar, através da pesquisa de sujidades, as condições de higiene dos biscoitos "Maizena" e "Cream-Cracker".

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 109 amostras de biscoitos adquiridos no comércio da cidade de São Paulo, durante o ano de 1984, assim distribuídas: 57 do tipo "Cream-Cracker" e 52 do tipo "Maizena".

As amostras foram submetidas ao método de digestão com pancreatina, descrito no "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" e no "Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists", com algumas modificações^{1, 2, 5, 6}.

Método

Para análise dos biscoitos tipos "Cream-Cracker" e "Maizena", foi utilizado o seguinte material:

Béquer de 2000 ml
Béquer de 250 ml
Proveta de 50 ml
Bastão de vidro
Frasco de Wildman (frasco armadilha)
Bico de Bünsen
Equipamento para filtração a vácuo
Papel de filtro
Microscópio estereoscópico

Foram empregados para esta mesma análise os seguintes reagentes:

Água à temperatura de 50°C
Solução de HCl a 2%
Solução de NaOH a 5%

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Solução de Na_3PO_4 a 5%
 Solução de pancreatina
 Formol
 Querosene (Varsol).

A técnica utilizada na elaboração da análise foi a seguinte:

Pesar 100 g da amostra em um béquer de 2.000 ml e dividi-la em pedaços. Adicionar, aproximadamente, 500 ml de água e deixar em repouso pelo período de meia hora. Homogeneizar a amostra no liquidificador. Adicionar exatamente 50 ml de solução de HCl a 2% e deixar ferver até que os resíduos fiquem finamente divididos e bem digeridos (quando não houver mais espuma durante a ebulição), agitando sempre com um bastão de vidro. Levantar a pH 6 com solução de NaOH a 5% e a pH 8 com solução de Na_3PO_4 a 5%.

Resfriar a amostra a uma temperatura abaixo de 40°C e adicionar 100 ml de solução de pancreatina. Agitar fortemente e reajustar o pH a 7-8 com solução de Na_3PO_4 a 5%, após o período de meia hora. Adicionar 0,2 ml de formol (quatro gotas) e deixar digerir durante a noite, em temperatura ambiente não superior a 40°C.

Quando a digestão estiver completa, ferver, resfriar e transferir a amostra para um frasco de Wildman de dois litros, usando água até um volume de aproximadamente 900 ml. Abaixar a rolha e adicionar 25 ml de Varsol. Inclinar o frasco a cerca de 45° e movimentar o disco do êmbolo em rápidos movimentos ascendentes e descendentes, para mesclar bem o líquido de extração, a água e a amostra, evitando formar bolhas de ar. Misturar por um minuto numa velocidade de 200 a 250 rotações por minuto, com fortes movimentos de rotação até que o líquido se ponha a girar, evitando perda ou derrame. Adicionar água

quente à temperatura de 50°C até que o líquido de extração quase atinja o gargalo. Agitar a camada inferior a cada 3-6 minutos, durante os primeiros 20 minutos, e deixar em repouso por 10 minutos.

Girar a rolha para remover o sedimento e sifonar, levantando a rolha até o mais próximo possível do gargalo, observando que a camada oleosa e uma quantidade maior ou igual a 1 cm do líquido abaixo da separação dos dois líquidos fique acima da borracha (rolha). Manter a rolha no lugar e transferir o líquido para um béquer. Repetir a operação de extração com 15 ml de Varsol, lavar o frasco recolhendo o líquido de extração dessa segunda operação para o mesmo béquer. Filtrar o líquido do béquer a vácuo em Büchner, com papel de filtro. Usar água quente para facilitar a operação.

Examinar os papéis ao microscópio estereoscópico, verificando a presença de insetos, fragmentos de insetos e pêlos de roedores⁴.

Preparação da solução de pancreatina — Pesar 20 g de pancreatina (National Formula) e adicionar 800 ml de água aquecida à temperatura de 38°C. Agitar em liquidificador por 10 minutos. Deixar em repouso por um período de 30 minutos e, em seguida, filtrar essa solução em algodão.

Para uso na técnica de digestão do biscoito, diluir 50 ml do filtrado em 50 ml de água destilada.

RESULTADOS

Os resultados da análise de sujidades em biscoitos estão relacionados na tabela 1. Como a legislação brasileira exige ausência de sujidades em qualquer tipo de alimento^{3,7}, vamos considerar aceitável a unidade em que não foi encontrado nenhum tipo de sujidade e inacei-

TABELA I

Sujidades em biscoitos

Sujidades		Biscoitos "Maizena"		Biscoitos "Cream-Cracker"	
		N.º	%	N.º	%
Fragmentos de insetos	0	2	3,85	0	0
	1 a 10	45	86,54	48	84,21
	11 a 20	4	7,69	8	14,03
	+ de 20	1	1,92	1	1,76
Total	—	52	—	57	—
Pêlos de roedores	0	49	94,23	55	97,50
	1 a 3	3	5,77	2	3,50
Total	—	52	—	57	—

TABELA 2

Classificação dos biscoitos "Maizena" e "Cream-Cracker" dentro dos parâmetros nacionais de qualidade

Amostras	Biscoitos "Maizena"	Biscoitos "Cream-Cracker"
	n.º (%)	n.º (%)
aceitáveis	2 (3,85)	0 (0)
inaceitáveis	50 (96,15)	57 (100)
Total	52	57

tável a unidade em que forem encontradas sujidades. Assim, chegamos aos resultados apresentados na tabela 2.

Dentre as amostras consideradas inaceitáveis, 3,5% das "Cream-Cracker" e 5,77% das "Maizena" são impróprias por conterem pêlos de roedores.

DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos verificamos que as 57 amostras de biscoitos do tipo "Cream-Cracker" estavam em condições higiênicas insatisfatórias, sendo duas impróprias para o consumo por conterem pêlos de roedores.

Seguindo o mesmo raciocínio, verificamos que as amostras de biscoitos "Maizena" também estavam em condições precárias de higiene, sendo três impróprias para o consumo por conterem pêlos de roedores.

Em relação ao número de fragmentos encontrados em cada um dos tipos de biscoito, "Cream-Cracker" e "Maizena", pode-se supor que uma das possíveis causas dessa diferen-

ça numérica se deva à diferença na formulação de cada um dos tipos. O biscoito "Maizena" possui um maior teor de gordura que atrapalha a extração, devido à formação de uma emulsão, a qual impede a subida dos fragmentos e pêlos em direção ao gargalo do frasco de Wildman. A consequência evidente verifica-se no menor número de fragmentos extraídos. Outra possível causa, menos provável, é a baixa qualidade das farinhas utilizadas para cada tipo de biscoito, supondo-se a utilização de uma farinha de qualidade inferior para o biscoito "Cream-Cracker".

CONCLUSÃO

Concluimos, portanto, que os biscoitos estão em condições higiênicas insatisfatórias, embora o número de fragmentos de insetos encontrado não seja grande.

Sugerimos que se dê continuidade às análises de biscoitos, utilizando-se de um método alternativo em que a hidrólise seja mais rigorosa, a fim de se eliminarem fatores limitantes nessa técnica de extração de sujidades leves.

RIALA6/597

ZAMBONI, C.Q. & BATISTIC, M.A. — Filth contamination of commercial biscuits sold in São Paulo City. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):61-64, 1985.

ABSTRACT: The pancreatin digestion method was used for detection of filth in 52 samples of "Maizena" biscuits and 57 samples of cream cracker sold in São Paulo city. It was found that 100% of cream cracker biscuits had had unhealthy handling in their manufacture because they showed insect fragments and 3.5% were unfit for human consumption because they showed rodent hairs. Of the "Maizena" biscuits, 96.15% had had unhealthy handling since they contained insect filth and 5.77% were unfit for human consumption because they contained rodent hairs. Further investigations by alternative methods are suggested.

DESCRIPTORS: biscuits, cream-cracker and "Maizena", filth microscopical analysis.

ZAMBONI, C.Q. & BATISTIC, M.A. — Verificação das condições higiênicas de biscoitos por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):61-64, 1985.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS — *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8th ed. St. Paul, Minnesota, AACC, 1983. v. 1 (AACC methods 28-31).
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th ed. Washington, DC, AOAC, 1980. p. 793. (Seccion 44.055).
3. BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução n.º 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11.514. Aprova as Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos e (bebidas)...
4. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION — *Training manual for analytical entomology in the food industry*, edited by J.R. Gorham. Washington, DC, FDA, 1977. p. 78-84. (FDA tech. bull. n.º 2).
5. KITELEY, E.J. — Some collaborative investigations on methods for isolating extraneous material from white flour. *J. Assoc. off. anal. chem.*, 37:139-47, 1955.
6. NICHOLSON, J.F. — Report of extraneous materials in backed products, cereals and egg products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 32:322-4, 1949.
7. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. — Decreto n.º 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 23 (NTA 48). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
8. ZAMBONI, C.Q. & Rodrigues, R.M.M.S. — Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):13-20, 1985.
9. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Partículas metálicas em farinha de trigo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):27-29, 1985.

Recebido para publicação em 9 de abril de 1985.

EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE ENDOTOXINA PRODUZIDA POR *ESCHERICHIA COLI*, NA MORFOLOGIA TÍMICA E NO DESENVOLVIMENTO PONDERAL DE CAMUNDONGOS JOVENS *

Marcos Kenzo FUNATSU **
Rodrigo Brito ERLICH **
Marcos Luís MONTAGNINI **
Carlos Alberto FERRANDEZ **
Cesar Augusto OGAWA **
Roberto A. Pinto PAES ***

RIALA6/598

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por *Escherichia coli*, na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

RESUMO: Este estudo descreve o efeito da injeção única, intraperitoneal de dose subletal de endotoxina, produzida por *Escherichia coli* na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. Os animais foram separados em grupos de doze, sacrificados a cada 24 horas durante cinco dias e ao final de cada experimento, um grupo controle recebeu injeção intraperitoneal de solução salina. Observou-se, neste experimento, nítida redução de peso corpóreo nas primeiras 48 horas, com recuperação após esta fase e redução no peso dos timos, assim como alterações histológicas importantes. Um outro grupo, formado por oito camundongos, teve seu desenvolvimento ponderal acompanhado durante dois meses. Neste experimento foram constatados sinais de recuperação após as primeiras horas, mas cujo desenvolvimento não chegou a alcançar níveis normais como os controles.

DESCRITORES: *Escherichia coli*, endotoxina; timo, morfologia; camundongos, desenvolvimento ponderal.

INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos e experimentais indicam que existe evidente associação entre infecção e alterações morfológicas do timo (CHANDRA¹, 1972; SMYTHE et alii¹⁵, 1971; FAULK et alii⁵, 1976; PAES et alii⁸, 1982). Sabe-se, também, que o timo está sujeito a alterações provocadas por agentes diversos, tais como raios X (TROWELL¹⁶, 1964), corticosteróides (SCHELINGER & MARK¹⁴, 1964), epinefrina (WILKES et

alii¹⁸, 1963), norepinefrina (WILKES & BRUNSON¹⁷, 1964) e reserpina (DRASKOCI & JANKOVIC³, 1964). Mais recentemente, tem-se estudado a ação de endotoxinas bacterianas na estrutura tímica (KIND⁷, 1967, e ROWLANDS¹¹, 1965).

O presente estudo é uma descrição do efeito de injeção única intraperitoneal de dose subletal de endotoxina bacteriana, na morfologia tímica de camundongos jovens e sua ação no desenvolvimento ponderal de camundongos.

* Realizado no Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

** Da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

*** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, e do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos isogênicos da cepa A/SN, aclimatados no biotério da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP. Estes camundongos foram selecionados de ninhadas com idade e peso semelhantes.

Um grupo de animais sofreu inoculação intraperitoneal de endotoxina para avaliação das doses (DL-100) e subletal (DL-50) que foram, respectivamente, 500 e 250 microgramas. A endotoxina utilizada foi obtida de *E. coli* 026:B6*.

Sessenta camundongos foram separados em diversos grupos e sacrificados doze a cada 24 horas, durante cinco dias. Para cada experimento houve um grupo-controle de seis animais no qual foi injetado intraperitonealmente solução salina. Um outro grupo, formado por oito camundongos, foi igualmente injetado com 250 microgramas de endotoxina e não sacrificado, sendo acompanhado seu desenvolvimento ponderal durante dois meses. Após a obtenção de peso corpóreo, procedeu-se ao sacrifício dos animais de cada grupo, determinando-se o peso do timo e colhendo-se amostras deste órgão para exame histológico. O material foi fixado em formol neutro tamponado a 10%, desidratado por passagens sucessivas em álcool e diafanizado pelo xilol. Os fragmentos foram embocados em parafina e submetidos a técnicas histológicas rotineiras, e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

Em relação ao grupo mantido para observação do desenvolvimento ponderal, os pesos dos animais foram tomados após 24 horas iniciais e, semanalmente, durante dois meses.

RESULTADOS

Varição do peso corpóreo de camundongos após inoculação intraperitoneal de 250 microgramas de endotoxina

Conforme pode-se observar na figura 1, uma nítida variação no peso corpóreo dos camundongos ocorreu em relação aos respectivos controles. Verificou-se que a redução mais acentuada do peso deu-se após 48 horas. A partir deste momento houve nítida recuperação, atingindo o peso inicial em torno do quinto dia após a inoculação.

Varição ponderal dos timos de camundongos após inoculação intraperitoneal com 250 microgramas de endotoxina

Como pode ser verificado na figura 2, uma variação importante no peso dos timos dos

camundongos inoculados ocorreu em relação aos timos dos camundongos-controle. Nos primeiros, a redução ponderal mais importante aconteceu no terceiro dia após a inoculação, ocorrendo a partir desta data, como acima mencionado, recuperação do peso do órgão.

Varição do desenvolvimento ponderal dos camundongos após dose única de 250 microgramas de endotoxina, durante período de nove semanas

Verifica-se na figura 3, a ocorrência de um retardo importante no desenvolvimento ponderal dos camundongos, recuperando níveis iniciais a partir da segunda semana sem, entretanto, atingir níveis normais, como os controles. Nota-se, inclusive, que mesmo após a nona semana, não há sinais de que esta relação mude.

Alterações histológicas observadas no timo, após injeção de dose única de endotoxina

O exame histológico dos timos dos camundongos tratados com endotoxina revela alterações regressivas e degenerativas importantes, sendo mais acentuadas naqueles sacrificados dentro das primeiras 24 horas. Observam-se extensas áreas de necrose celular, predominantemente dos pequenos linfócitos corticais. Nessas áreas há acentuada cariorexis e presença de numerosos macrófagos com restos celulares em seu citoplasma (figuras 5 e 6. Comparar com figura 4, timo normal).

Nos dias subsequentes houve aumento da atividade macrofágica na zona cortical, com evidente diminuição da população celular. Ao completar 72 horas da administração da endotoxina, a depleção linfocítica atingiu o máximo. Nesse momento observou-se uma inversão córtico-medular, pois os linfócitos medulares foram aparentemente menos atingidos do que aqueles corticais (figura 7). Os lóbulos tímicos são pequenos e irregulares. A partir deste dia observou-se sinais de recuperação do órgão.

DISCUSSÃO

Na literatura médica especializada encontram-se poucas publicações sobre relações entre presença de endotoxinas bacterianas e desenvolvimento ponderal e do timo de camundongos (ROWLANDS¹¹, 1965; GAD & CLARK⁶, 1965; EKSTEDT⁴, 1964; KIND⁷, SALVIN et alii¹³, 1965). Todos esses autores descrevem alterações idênticas ou semelhantes às encontradas no presente trabalho.

* Fornecida comercialmente por Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA.

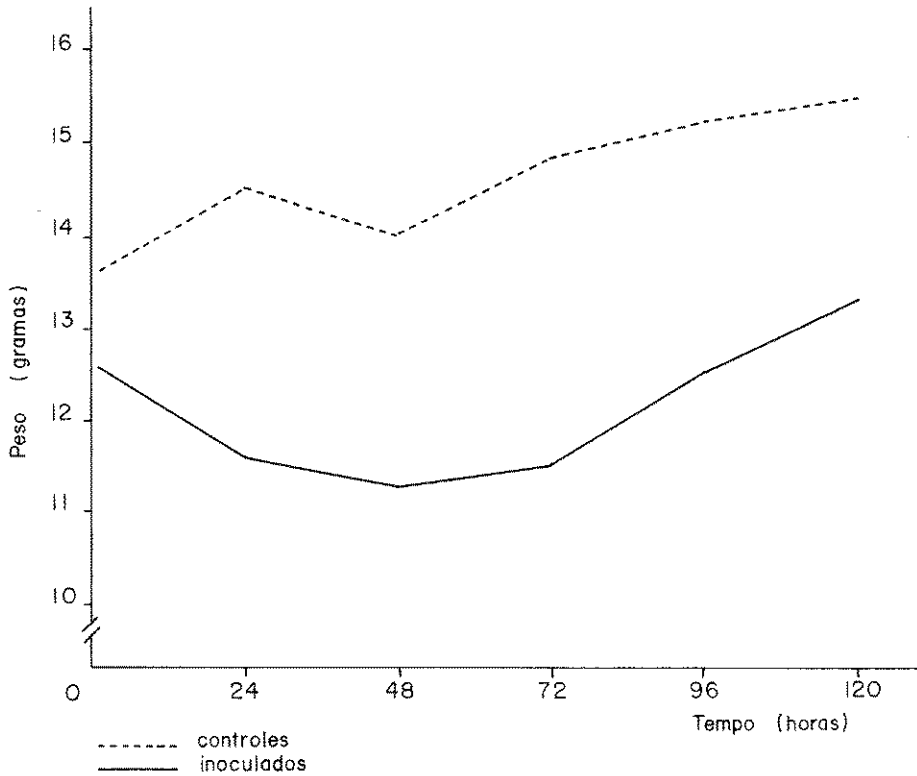


FIGURA 1 — Variação do peso dos camundongos após inoculação intraperitoneal de 250 μg de endotoxina de *E. coli* e controles.

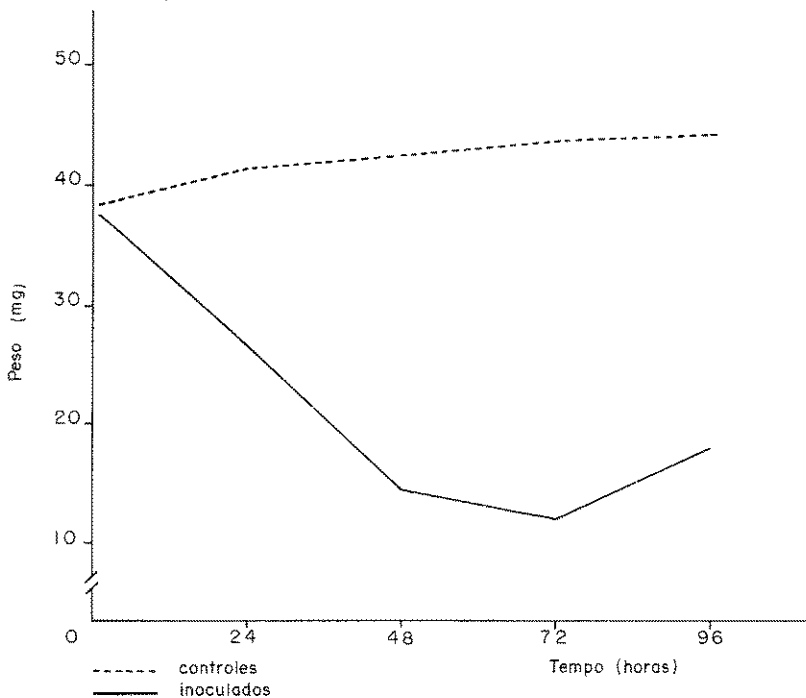


FIGURA 2 — Variação do peso do timo de camundongos inoculados i.p. com 250 μg de endotoxina de *E. coli* e controles.

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por "escherichia coli", na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

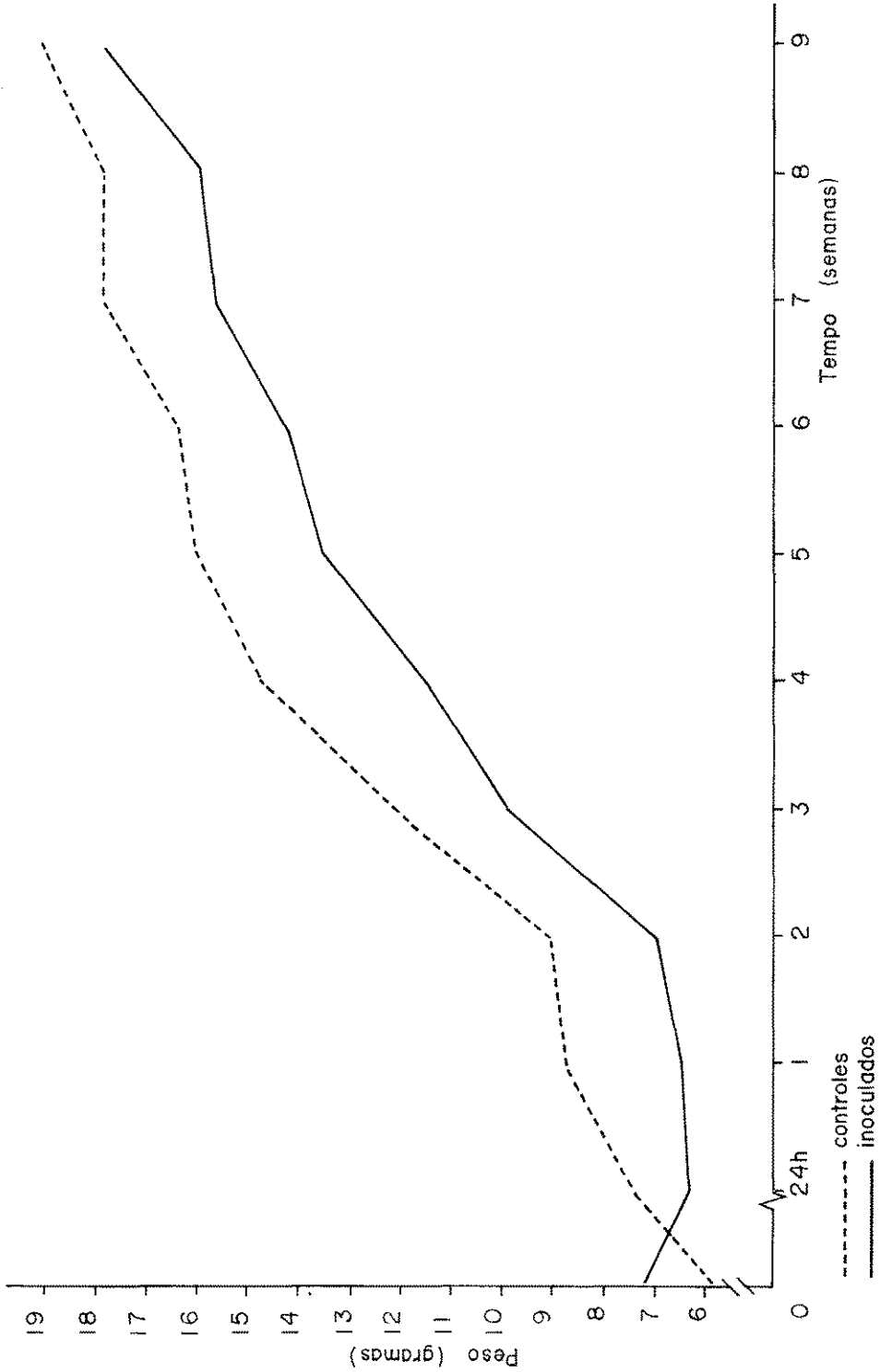


FIGURA 3 — Variação do desenvolvimento ponderal de camundongos A/SN, após dose de 250 μ g de endotoxina.

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por "escherichia coli", na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

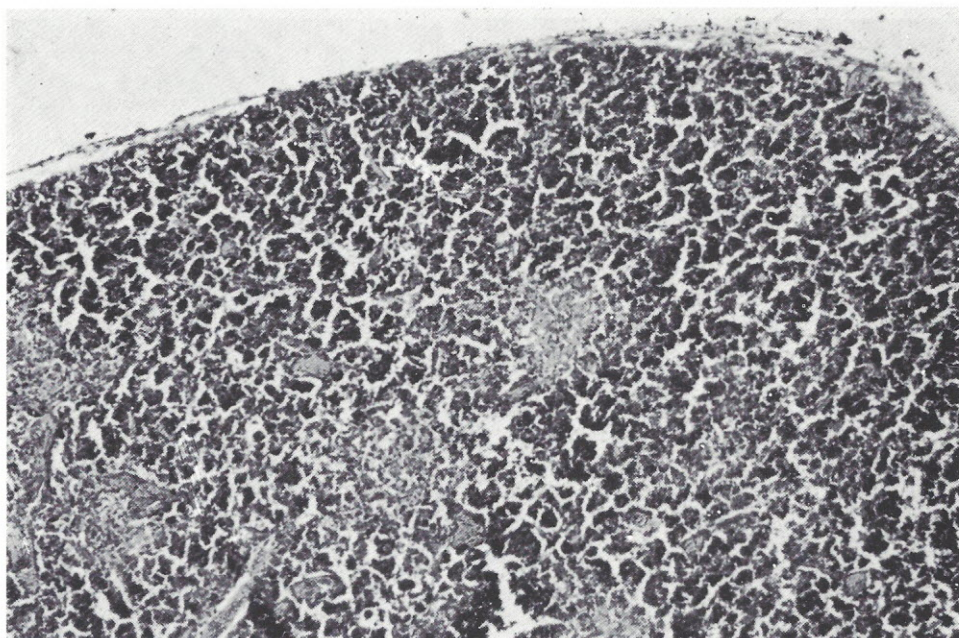


FIGURA 4 — Timo normal. Notar diferenciação nítida entre a cortical e a medular, H.E. 190 x, ampliada.

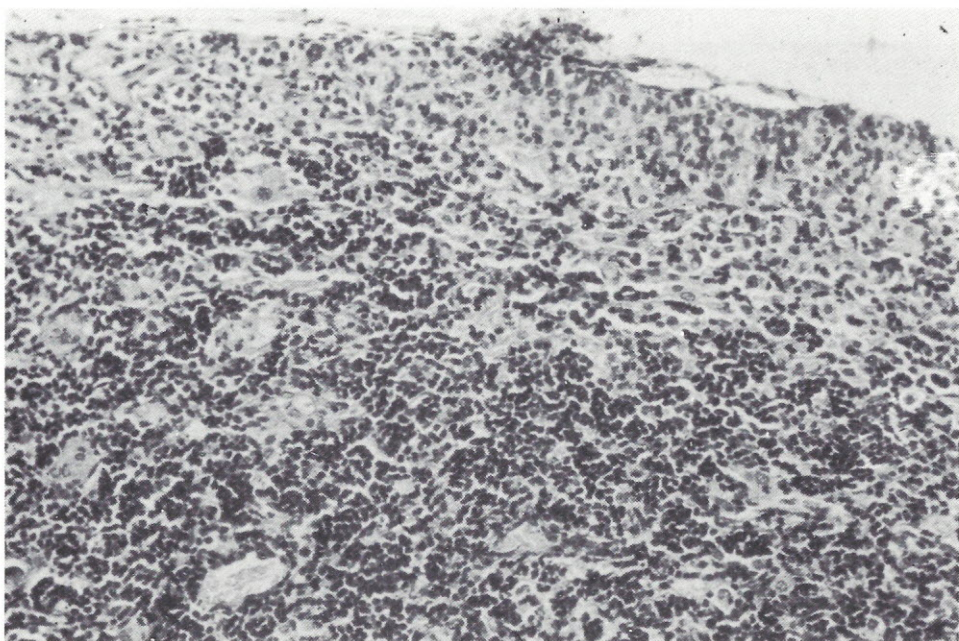


FIGURA 5 — Timo, 24 horas após injeção de endotoxina. Verificar rarefação da população celular cortical. H.E. 190 x, ampliada.

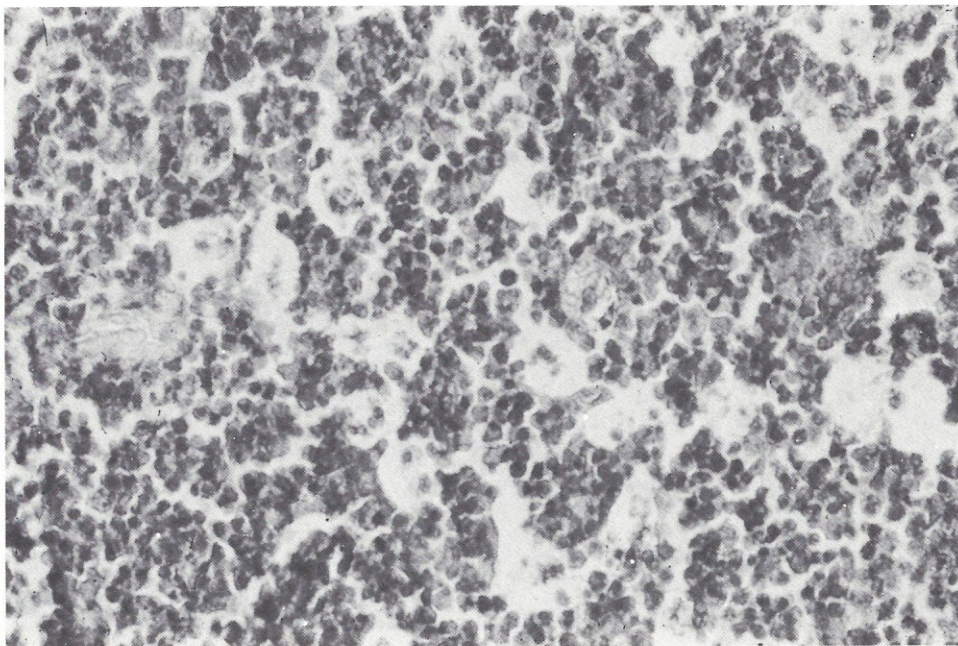


FIGURA 6 — Timo, 24 horas após injeção de endotoxina. Maior aumento da figura 5, para mostrar rarefação celular e atividade macrofágica aumentada, com restos celulares intracitoplasmáticos.

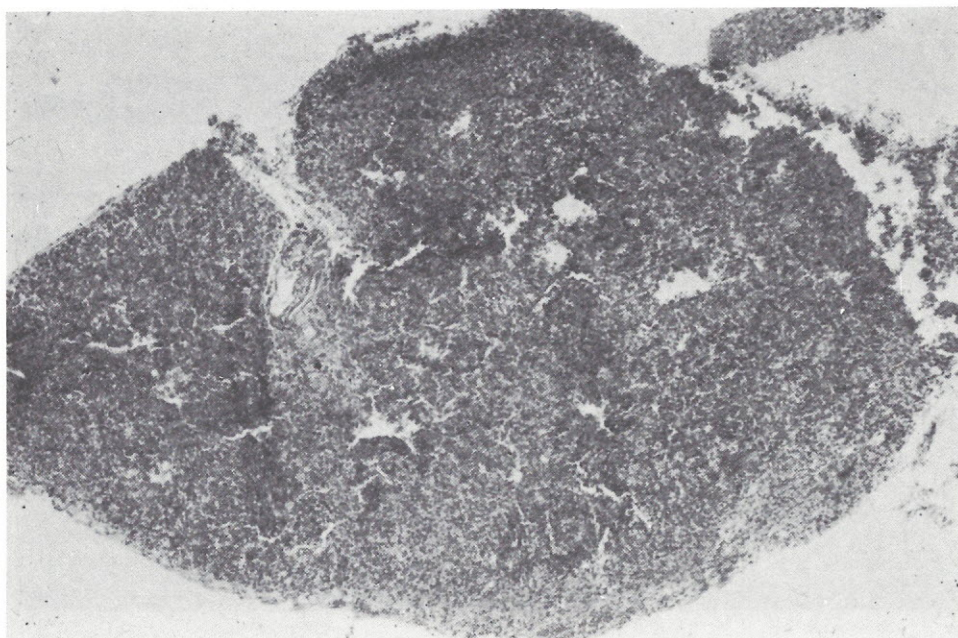


FIGURA 7 — Timo, 72 horas após injeção de endotoxina. Observar redução acentuada do lóbulo tímico, por rarefação celular máxima. H.E. 190 x, ampliada.

Quanto ao efeito de endotoxina no timo de camundongos jovens, ROWLANDS¹¹ (1965), procedeu à injeção simples endovenosa de endotoxina de "Salmonella typhi" e analisou aspectos bioquímicos e estruturais do timo. As mudanças observadas mais precocemente como a necrose dos linfócitos e o aparecimento de células pironinofílicas na córtex foram acompanhadas por perda de peso do timo e diminuição dos níveis de ácidos nucleicos.

A atividade da endotoxina como agente linfocitolítico em tecidos extratímicos (ROWLANDS¹¹, 1965) não se compara, em intensidade, com seus efeitos sobre os linfócitos tímicos. Tais variações sugerem que a localização anatômica influencia certos aspectos metabólicos dos linfócitos. Este conceito é sustentado pelo trabalho de TROWELL¹⁶ (1964), onde afirma que linfócitos dos linfonodos são mais sensíveis à irradiação por raios X, do que aqueles da circulação periférica. A maior parte das lesões iniciais é dirigida diretamente para os pequenos linfócitos da córtex do timo.

A destruição dos pequenos linfócitos corticais pela endotoxina, no entanto, não é facilmente explicada, pois o efeito direto dessa droga em linfócitos *in vitro* só ocorre em altas doses. É possível que os danos celulares observados aconteçam através da liberação de hormônios adrenais, sabidamente possuidores de efeito linfocitolítico.

Alterações morfológicas do timo associadas a infecções têm sido relatadas na literatura médica, apresentando, em muitos casos, comportamento sinérgico, freqüentemente não se podendo estabelecer com clareza mecanismos de causa e efeito (SMYTHE et alii¹⁵, 1971; CHANDRA², 1975, FAULK et alii⁵, 1976; PAES et alii¹⁰, 1982).

No material coletado encontramos em todos os casos grande destruição de células da córtex do timo, caracterizadas por aglutinação de pequenos linfócitos, apresentando freqüentemente alterações nucleares, como cariopícnose e, principalmente, cariorexis.

Além da acentuada alteração morfológica tímica, demonstrou-se no presente trabalho que endotoxinas bacterianas podem ter papel, coadjuvante ou não, no desenvolvimento ponderal do animal inoculado. Em relação a este aspecto há excelente trabalho sobre a síndrome que ocorre em ratos timectomizados e inoculados com endotoxina de *S. typhi* (SALVIN et alii¹³, 1965). Estes autores sugerem que as manifestações conspuivas, verificadas nos animais, sejam decorrentes de defeito na capacidade de resistência aos efeitos da endotoxina.

Perda de peso corpóreo em camundongos injetados com endotoxina foi também estudada por KIND⁷ (1967), onde demonstrou que injeções de endotoxina em camundongos recém-nascidos causam parada temporária no crescimento.

Não há uma explicação totalmente convincente para este fato, mas não podemos deixar de ter em mente que o timo não é apenas um órgão do sistema imunológico. Sabe-se que o timo tem também um papel endócrino, inclusive relacionado com o crescimento (SALVIANO et alii¹², 1983).

Não se pode afastar a possibilidade de a perda ponderal aguda, momentânea, ser devida à ação pirogênica da endotoxina. Entretanto, a perda crônica pode relacionar-se a fatores endócrinos tímicos. É possível, portanto, que o baixo peso de crianças desnutridas que freqüentemente são vítimas de infecções por germes gram-negativos esteja relacionado com a endotoxina produzida por estes microrganismos.

RIAL6/598

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Effect of the inoculation of *Escherichia coli* endotoxin on the thymus histology and weight of young mice. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

ABSTRACT: The effect of intraperitoneal injection of sub-lethal doses of *Escherichia coli* endotoxin on the thymus histology and on weight were studied in young mice. Mice were distributed into twelve groups. Each group of young mice was killed at intervals of 24 hours during five days. A control group consisting of mice of the same age was inoculated with saline solution. Another control group was weighted during two months.

In the first experiment, the inoculated mice showed weight loss in the first 48 hours and a later recovery. The thymus of these animals showed significant alterations of weight and of histological structure. In the second control group, the weight loss was maintained during the observation period, despite some recuperation after the initial hours.

DESCRIPTORS: *Escherichia coli*, endotoxin; thymus, morphology; mice, weight development.

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por "escherichia coli", na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANDRA, R.K. et alii — Immunocompetence in undernutrition. *Trop. Pediatrics*, 81: 1194, 1972.
2. CHANDRA, R.K. — Reduced secretory antibody response to live attenuated measles and poliovirus vaccines in malnourished children. *Br. Med. J.*, 2:583-5, 1975.
3. DRASKOCI, M. & JANKOVIC, B.D. — Involution of thymus and suppression in rats treated with reserpine. *Nature*, Lond., 202: 408-9, 1964.
4. EKSTEDT, R.D. — Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines. *J. exp. Med.*, 120:793-804, 1964.
5. FAULK, P.; PAES, R.A.P.; MARIGO, C. & JONES, J.V. — The immunological system in health and malnutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, 35:253-61, 1976.
6. GAD, P. & CLARK, S.L., JR. — Involution and regeneration of the thymus in mice, induced by bacterial endotoxin and studied by quantitative histology and electron microscopy. *Am. J. Anat.*, 122:573-606, 1965.
7. KIND, P. — Endotoxin induced wasting disease in mice: a temporary condition explained by endotoxin tolerance. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 125:495-8, 1967.
8. PAES, R.A.P. — Anatomia patológica do sarampo com especial referência ao timo. São Paulo, 1982. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]
9. PAES, R.A.P.; CHIEFFI, P.P. & D'ANDRETTA NETO, C. — Estrongiloidíase disseminada de evolução fatal em crianças desnutridas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39:171-8, 1979.
10. PAES, R.A.P.; CHIEFFI, P.P.; D'ANDRETTA NETO, C. & NASCIMENTO, M.F. — Pneumonia intersticial por *Pneumocistis carinii* em crianças desnutridas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 24:188-92, 1982.
11. ROWLANDS, D.T. — The effect of endotoxin on the thymus of young mice. *Am. J. Pathol.*, 146:165-76, 1965.
12. SALVIANO, W.; SANTA ROSA, G.L. & VILLA VERDE, D.M. — O timo como glândula endócrina. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, 35:1685-99, 1983.
13. SALVIN, S.B.; PETERSON, R.D.A. & GOOD, R.A. — The role of the thymus in resistance to infection and endotoxin toxicity. *J. Lab. clin. Med.*, 65:1004-22, 1965.
14. SCHELINGER, M. & MARK, R. — Wasting disease in young mice by administration of cortisol acetate. *Science*, Wash., DC, 143:965-6, 1964.
15. SMYTHE, P.M.; SCHONLAND, M.; BRETON-STILES, G.G.; COOVADIA, H. M.; GRACE, H.J.; LOENING, W.E.K.; MAFAYANE, A. & PARENT, M.A. — Thymolymphatic deficiency and depression of cell mediated immunity in protein-calorie malnutrition. *Lancet*, 2:939, 1971.
16. TROWELL, O.A. — The sensitivity of lymphocytes to ionizing radiation. *J. Pathol. & Bacteriol.*, 64:687-704, 1964.
17. WILKES, T.E. & BRUNSON, J.G. — Effects of levaterenol on newborn rabbits. *Lab. Invest.*, 13:112-9, 1964.
18. WILKES, T.E.; IMRIE, S.T. & BRUNSON, J.G. — Effects of epinephrine on newborn rabbits. *Am. J. Pathol.*, 43:825-36, 1963.

Recebido para publicação em 5 de maio de 1985.

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ISOLADA DE SANGUE *

Cláudio Tavares SACCHI **
Maria Lúcia Ceccconi TONDELLA **
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Marinella Della Negra de PAULA **

RIALA6/599

SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.;
PAULA, M.D.N. — *Corynebacterium diphtheriae* isolada de sangue. Rev. Inst.
Adolfo Lutz, 45(1/2):73-79, 1985.

RESUMO: Foi isolado *C. diphtheriae* de 3 amostras de sangue de um paciente internado no Hospital Emílio Ribas, que não apresentava suspeita clínica de difteria. Analisou-se o aspecto morfológico, comportamento bioquímico e toxigênico destas cepas e verificou-se a presença dos biotipos *intermedius*, *mitis* e *mitis* variedade *belfanti*. O comportamento bioquímico foi idêntico para as cepas isoladas, com exceção da presença de nitrato redutase do tipo A nos biotipos *intermedius* e *mitis*. Esses dois biotipos mostraram não ser toxigênicos quando testados pelo método de Elek, enquanto o biotipo *mitis* var. *belfanti* mostrou-se toxigênico quando empregado o mesmo método. Foi observado não haver variações na sensibilidade dos diferentes antibióticos frente aos agentes antimicrobianos testados.

DESCRITORES: *Corynebacterium diphtheriae*, isolamento de sangue humano; sangue, isolamento de *Corynebacterium diphtheriae*.

INTRODUÇÃO

Bacilos gram-positivos com morfologia similar à apresentada pelo bacilo diftérico são largamente encontrados na natureza. A detecção destes bacilos em culturas de sangue é geralmente considerada como sendo contaminação, pelo fato destes microrganismos estarem comumente presentes na pele e membranas mucosas normais^{18, 22}.

Septicemia pelo bacilo diftérico é ocasionalmente observada, entretanto, WILDFUHR²⁴ sugere que infecções generalizadas por este bacilo ocorram com maior frequência do que se tem relatado.

Nos últimos 30 anos, somente 6 casos de endocardite por *C. diphtheriae* foram relatados, todos em crianças, com exceção de um caso em adulto, descrito por SANDLER¹⁹. Segundo REID & GREENWOOD¹⁷, as endocardites causadas pelo bacilo diftérico representam 0,3% do total de endocardites.

O presente relato vem demonstrar a importância da identificação de bacilos gram-positivos aeróbios isolados de sangue, bem como

descrever as características morfológicas, bioquímicas e toxigênicas das cepas isoladas de três amostras de sangue de uma mesma paciente.

DESCRIÇÃO DO CASO

Uma paciente de 11 anos de idade, com histórico de uma semana de febre, tremores e fraqueza no braço e perna esquerda, foi internada no Hospital Emílio Ribas em 7 de agosto de 1983. No aparelho cardiovascular apresentou sopro sistólico de grau IV e VI, em foco mitral, hiperfonese de B2. A bacterioscopia e cultura de líquido cefalorraquidiano apresentaram-se negativas, enquanto que o exame quimicitológico revelou a presença de 380 células por mm³ (95 neutrófilos e 3 linfócitos), 2.133 hemácias por mm³, 58 mg% de proteínas, 59 mg% de glicose e presença de globulinas, levando a uma suspeita diagnóstica de meningite bacteriana mais sopro cardíaco a esclarecer. Foi iniciado o tratamento com ampicilina (2,5 g de 6 em 6 h). No decorrer da internação e na vigência do 5.º dia da antibioticoterapia, a doente

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP.

permaneceu febril, com quadro neurológico agravado, hemiparesia à esquerda, desvio de Rima e dislalia. As hemoculturas detectaram a presença de bactérias tidas como contaminantes. Considerando-se a evolução clínica e os resultados dos exames laboratoriais, suspeitou-se de uma endocardite bacteriana, tendo sido administrada penicilina cristalina e staficilin, pelo período de 52 dias, e através da arteriografia cerebral, foi detectada obstrução carotídea interna e externa direita. O ecocardiograma não revelou anormalidades.

A paciente foi transferida para o Hospital Beneficência Portuguesa, em São Paulo, SP, para melhor exploração valvular, quando foi diagnosticada uma insuficiência mitral com achado cirúrgico de válvula mitral com cúspides retraídas e importante deficiência de coalescência atrial. Foi então realizada a cirurgia em 9 de novembro de 1983, com evolução benigna.

MATERIAL E METODOS

Foram estudadas quatro cepas de *C. diphtheriae* isoladas de três amostras de sangue.

As hemoculturas foram feitas em caldo triptona de soja, acrescido de 0,025% de sulfonato de polianetol sódico e processadas segundo BRANDILEONE⁴. Foram isolados bacilos gram-positivos, não-esporulados, pleomórficos, dispostos em paliçada, que apresentaram granulações metacromáticas evidenciadas pela coloração de Albert Laybourn. Estes bacilos foram semeados em placa de ágar-sangue-cistina-telurito²⁰ e incubados em estufa, à temperatura de 37°C pelo período de 48 horas, de onde se obteve colônias características do gênero *Corynebacterium*.

Para a identificação bioquímica, biotipagem, pesquisa de toxigenidade e sensibilidade a agentes antimicrobianos, utilizou-se como inóculo uma cultura em ágar-Muller-Hilton-sangue a 5%, incubada por 24 horas, em estufa a 37°C.

As seguintes provas foram utilizadas para a identificação bioquímica:

Comportamento em relação ao oxigênio — Para a determinação da relação das cepas frente ao oxigênio, foi analisada a presença ou não de crescimento em toda extensão de um tubo de ensaio de 8 x 180 mm, contendo 5 ml de ágar - extrato de carne - extrato de levedura a 1,5% (gelose VL)¹¹. O meio foi fundido, distribuído e estabilizado à temperatura de 55°C em banho-maria. O inóculo constou de uma suspensão bacteriana feita em água destilada estéril, com uma densidade de aproximadamente trezentos milhões de células por mililitro (n.º 1 da escala de McFarland). A semeadura foi feita com auxílio de uma pipeta Pasteur longa, de ponta fechada, que foi introduzida na suspensão bacteriana e, posteriormente, no tubo com gelose

VL, até o fundo, e retirada com movimentos circulares. Este processo foi repetido por duas vezes e os tubos incubados por 24 horas em estufa a 37°C.

Catalase — A presença da enzima catalase foi verificada em lâmina, de acordo com a técnica citada por MAC FADDIM¹³.

Oxidase — A ausência de citocromo oxidase foi verificada utilizando-se uma solução aquosa de p-aminodimetilamino oxalato a 1%⁶.

Redução de nitratos — A redução de nitratos a nitritos foi verificada em tubos de caldo comum (extrato de carne, 5,0 g; bactopeptona, 10,0 g; NaCl, 5,0 g; e água destilada 1.000 ml), ao qual foi adicionado 0,1% de KNO₃. Após ser semeado, o tubo foi incubado pelo período de 48 horas, em estufa a 37°C. A leitura foi realizada segundo método descrito por COWAM & STEEL⁸.

Pesquisa do tipo de nitrato redutase — O tipo de nitrato redutase (A ou B) foi determinado de acordo com a técnica de PICHINOTY & PIECHAUD¹⁸, utilizando-se a gelose VL mais 0,1% de clorato de potássio. O meio foi distribuído, semeado e incubado de maneira idêntica à utilizada para a determinação do comportamento das cepas frente ao oxigênio.

Cisteinase — A pesquisa de cisteinase foi feita em meio de Tinsdale modificado, segundo MOORE & PARSONS¹⁵, e em meio de Pisu & Guarnacci, como descrito por SARAGEA *et alii*²⁰. Foram distribuídos 2 ml de meio por tubo de 12 x 120 mm e a inoculação foi feita com picada central em profundidade⁵. A leitura foi realizada após incubação em estufa pelo período de 24 horas, a 37°C.

Fermentação de carboidratos — Foi utilizado o meio de Hiss, segundo SARAGEA²⁰, como meio base para a verificação da fermentação de carboidratos. Estes açúcares foram esterilizados por filtração (membranas Millipore de 0,45 e de 0,22 μ) e adicionados ao meio base, obtendo-se uma concentração final de 1%. O amido e a dextrina foram esterilizados em autoclave a 105°C, por 20 minutos, e adicionados ao meio base, obtendo-se uma concentração final 0,4 e 1%, respectivamente²⁰. O meio foi distribuído em tubos de 12 x 120 mm, que foram incubados em estufa a 37°C, com leituras diárias de até quinze dias.

Hidrólise do tween 80 — A hidrólise do tween 80 foi verificada pelo método de SIERRA²¹ e as placas incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com leituras diárias de até sete dias.

DNase — A desoxirribonuclease foi demonstrada em placa de ágar DNase (*bacto DNase test ágar*) conforme a técnica Difco⁹.

* Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA.

As provas de hidrólise da esculina (gelose esculina), hidrólise da uréia (meio uréia indol) e presença de motilidade (meio manita-motilidade-nitrato), foram feitas e interpretadas de acordo com "Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur"¹³.

Os biotipos de *C. diphtheriae* foram caracterizados por SARAGEA *et alii*²⁰, onde foram analisadas as características morfológicas em ágar sangue cistina telurito de potássio (CTBA) e caldo nutritivo, e fisiológicas, pela fermentação do amido, dextrina, redução de nitratos e atividade hemolítica.

Hemólise — A atividade hemolítica foi observada em placas de ágar-sangue (10%) desfibrinado de carneiro, coelho e cobaia, com leituras feitas após o período de 24 e 48 horas de incubação em estufa à temperatura de 37°C, e em tubo com 0,5 ml de uma suspensão a 5% das hemácias lavadas de carneiro, coelho e cobaia, mais 1 ml de cultura de 24 horas em caldo comum e 0,5 ml de solução salina a 0,85%. Os tubos foram encubados em banho-maria à temperatura de 37°C e as leituras foram feitas com intervalos de 1, 4, 6 e 24 horas de incubação¹⁰.

Características em caldo — O tipo de crescimento em caldo nutritivo foi verificado após o período de 24 horas de incubação em estufa à temperatura de 37°C.

O estudo do comportamento toxigênico foi realizado através da pesquisa *in vitro* de toxina diftérica pelo teste de Elek, segundo KING & PARSONS¹², onde cada fita de papel de filtro estéril foi impregnada com 100 UI de antitoxina diftérica, procedente do Instituto Butantã, São Paulo, SP.

O teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizado de acordo com a técnica de BAUER *et alii*¹, onde foram utilizados discos impregnados com eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), canamicina (30 µg), gentamicina (10 µg), carbenicilina (100 µg), estreptomina (10 µg), vancomicina (30 µg), ampicilina (30 µg), ácido nalidixico (30 µg), sulfonamidas (300 µg) e oxacilina (5 µg)*.

RESULTADOS

Das três amostras de sangue, foram isoladas quatro cepas (A, B, C e D) e identificadas como *C. diphtheriae*. Estas cepas apresentaram comportamentos bioquímicos semelhantes, conforme demonstrado na tabela 1 da página seguinte.

A cepa A, isolada da amostra 1, apresentou nitrato redutase do tipo A, enquanto que as cepas B e C, isoladas das amostras 2 e 3, não apresentaram esta enzima. Um número

de 24 colônias de cada amostra foi então analisado quanto à presença da enzima nitrato redutase e conseguiu-se isolar uma única colônia, apenas da amostra 3, que apresentou nitrato redutase, também pertencente ao tipo A (cepa D).

De acordo com o esquema de biotipagem, verificou-se que a cepa A pertencia ao biotipo *intermedius*, as cepas B e C ao biotipo *mitis* variedade *belfanti* e a cepa D ao biotipo *mitis*, conforme mostra a tabela 2, na pág. 77.

As cepas B, C e D não fermentaram o amido e foram morfológicamente idênticas ao biotipo *mitis*, quanto às características coloniais, microscópicas e tipo de crescimento em caldo, apesar de não apresentarem lise de sangue de carneiro, coelho e cobaia.

O comportamento toxigênico das 4 cepas estudadas mostrou ser variado. As cepas A e D não foram toxigênicas, enquanto que as cepas B e C, biotipo *mitis* var. *belfanti*, apresentaram prova de Elek positiva, respectivamente no 5.º e 6.º dias de incubação (tabela 2).

As 4 cepas de *C. diphtheriae* mostraram o mesmo perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados, apresentando resistência apenas à tetraciclina, sulfonamidas e ácido nalidixico.

DISCUSSÃO

Pela análise da tabela 2, observamos que as cepas de *C. diphtheriae* biotipo *mitis* foram assim classificadas, mesmo não tendo apresentado atividade hemolítica. HEWITT¹⁰, no entanto, mostrou que nenhuma das cepas do biotipo *intermedius* por ele estudadas apresentou atividade hemolítica, mas que dentre ambos os biotipos, *gravis* e *mitis*, algumas foram hemolíticas e outras não. Em relação ao biotipo *mitis*, 27,5% das 120 cepas estudadas pelo mesmo autor não apresentaram esta atividade.

Com respeito às similaridades do comportamento bioquímico e morfológico, e diferenças na habilidade das duas variantes do biotipo *mitis* em reduzir o nitrato, podemos supor que a variante nitrato redutase positiva seja mutante da variante nitrato redutase negativa, uma vez que apenas 2,08% das colônias do biotipo *mitis* analisadas mostraram possuir esta enzima.

Através de nossos resultados, podemos observar que apenas as duas variantes *belfanti* do biotipo *mitis* foram toxigênicas. Geralmente as cepas de *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti* não são toxigênicas². Misturas de *C. diphtheriae* toxigênicas e não-toxigênicas têm sido encontradas em lesões de pele³. CHANG⁷ reportou a presença de *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti*, isolado de garganta

* Provenientes da Fármaco Diagnóstica Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

TABELA 1

Comportamento bioquímico das 4 cepas de C. diphtheriae

Propriedades e substratos	CEPAS			
	A (Amostra 1)	B (Amostra 2)	C (Amostra 3)	D (Amostra 3)
Comportamento em relação ao oxigênio	AAF *	AAF	AAF	AAF
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	—	—	—	—
Motilidade a 22 °C	—	—	—	—
Redução de nitratos	+	—	—	+
Cisteinase	+	+	+	+
Tipo de nitrato redutase	A **	—	—	A
Hidrólise da uréia	—	—	—	—
Hidrólise do tween 80	—	—	—	—
Hidrólise da esculina	—	—	—	—
DNase	+	+	+	+
Fermentação de				
Amido	—	—	—	—
Dextrina	+	+	+	+
Galactose ***	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+
Levulose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+
Manitol	—	—	—	—
Sacarose	—	—	—	—
Salicina	—	—	—	—
Trealose	—	—	—	—
Hemólise	—	—	—	—

* Aeróbica anaeróbica facultativa.

** Tipo A de nitrato redutase.

*** Prova positiva com 48 horas de incubação.

(+) Prova positiva.

(—) Prova negativa.

(—) Prova não realizada.

TABELA 2

*Características morfológicas, bioquímicas e toxigênicas dos biotipos de C. diphtheriae isolados **

Cepas	Características coloniais	Características microscópicas	Tipo de crescimento em caldo	Nitrato redutase	Elek **	Biotipos
A	0,5 a 1,0 mm de \varnothing pretas planas, com centro um pouco elevado, lisas	Bacilos longos, com poucas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, sem película	+	-	<i>intermedius</i>
B	2,0 a 3,0 mm de \varnothing centro preto com bordos claros, convexa, lisas	Bacilos médios, com muitas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, com película	-	+	<i>mitis</i> var. <i>belfanti</i>
C	2,0 a 3,0 mm de \varnothing centro preto com bordos claros, convexa, lisa	Bacilos médios, com muitas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, com película	-	+	<i>mitis</i> var. <i>belfanti</i>
D	2,0 a 3,0 mm de \varnothing centro preto com bordos claros, convexa, lisa	Bacilos médios, com muitas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, com película	+	-	<i>mitis</i>

* As provas de fermentação do amido e hemólise foram negativas para todos os biotipos.

** Prova de toxigenicidade *in vitro*.

(+) Prova positiva.

(-) Prova negativa.

de um único paciente, que apresentou variantes toxigênicas e não-toxigênicas.

É importante ressaltar que a paciente sofreu uma bacteremia por dois biotipos diferentes de *C. diphtheriae*, os biotipos *intermedius* e *mitis*.

Agradecimentos

Agradecemos à Srta. Kinue Irino, pela valiosa orientação recebida na elaboração deste trabalho e à Sra. Sonia Shigue Okita Buschinelli, pela colaboração no teste de sensibilidade aos antibióticos estudados.

RIALA6/599

SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. — Isolation of *Corynebacterium diphtheriae* from human blood. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):73-79, 1985.

ABSTRACT: *C. diphtheriae* was isolated and identified from 3 blood specimens from a patient without clinical manifestation of diphtheriae. Morphology and biochemical and toxigenic properties of the three isolates corresponded to biotypes *intermedius*, *mitis*, and *mitis* variety *belfanti*. The biochemical properties were identical for the three isolates, except for type A nitrate-reductase in biotypes *intermedius* and *mitis*. These biotypes were not toxigenic when tested by Elek method. Biotype *mitis* variety *belfanti* was toxigenic. There was no difference in the behavior of isolates against the tested anti-microbial agents.

DESCRIPTORS: *Corynebacterium diphtheriae*, isolation from human blood; blood, isolation of *C. diphtheriae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, A.W.; KIRPY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Pathol.*, 45:493-6, 1966.
2. BEZJAK, V. — Differentiation of *C. diphtheriae* of the *mitis* type found in diphtheria and Ozaena. *Antonie van Leeuwenhder*, Amsterdam, 20:269-271, 1954.
3. BEZJAK, V. & FARSEY, S.J. — *C. diphtheriae* in skin lesions in Ugandan children. *Bull. WHO*, 43:643-50, 1970.
4. BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.M. & PESSOA, G.V.A. — Considerações sobre os resultados de 5.860 casos de hemoculturas realizadas em pacientes do município de São Paulo, entre 1979 e 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44: - , 1984.
5. BROOKS, R. — *Guidelines for the laboratory diagnosis of diphtheriae*. Geneva, WHO [1981]. 27 p. (LAB/81.7).
6. CARPENTER, C.M.; SUHLAND, L.G. & MORRISON, M. — The oxalate salt of p-aminodimethylaniline, an improved reagent for the oxidase test. *Science*, Wash., DC, 105:649, 1947.
7. CHANG, N.D.; LAUGHREN, G.S. & CHALVARDJIAN, N.E. — Three variants of *C. diphtheriae* subsp. *mitis* (*belfanti*) isolated from a throat specimen. *J. clin. Microbiol.*, 8:(6)767-8, 1978.
8. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. — *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University press, 1975. p. 167.
9. DIFCO LABORATORIES — *Difco manual: medios de cultivo desidratados y reacciones para microbiologia*. 10.ª ed. Detroit, Mich., Difco, 1984. p. 263.
10. HEWITT, L.F. — Haemolytic activity of *C. diphtheriae*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 59: 145-57, 1947.
11. INSTITUT PASTEUR — *Milieux et réactifs de Laboratoire Pasteur*. Paris, Inst. Pasteur, 1978. p. 83, 116, 186.
12. KING, E.O.; FROBISHER, M. & PARSONS, E.I. — The *in vitro* test for virulence of *C. diphtheriae*. *Amer. J. Public Health*, 39:1314-20, 1949.
13. MAC FADDIN, J.F. — *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980, p. 51-58.
14. McLEOD, J.W. — The types *mitis intermedius* and *gravis* of *C. diphtheriae*. *Bacteriol. Rev.*, 7:1-41, 1943.
15. MOORE, M.S. & PARSONS, E.I. — A study of a modified Tinsdale's medium for the primary isolation of *C. diphtheriae*. *J. infect. Dis.*, 102:88-93, 1958.
16. PICHINOTY, F. & PIECHAUD, M. — Recherche des nitrate-reductase A et B: méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 114: 77-98, 1968.

SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. — *Corynebacterium diphtheriae* isolada de sangue. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):73-79, 1985.

17. REID, J. & GREENWOOD, L. — Corynebacterial endocarditis. *Arch. intern. Med.*, 119:106-10, 1967.
18. RILEY, P.S.; HOLLIS, D.G.; UTTER, G.B.; WEAVER, R.E. & BAKER, C.N. — Characterization and identification of 95 diphtheroid (Group JK) cultures isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 9:418-424, 1979.
19. SANDLER, M. — *C. diphtheriae* endocarditis in an adult with congenital cyanotic heart disease. *S. afr. med. J.*, 61:594, 1982.
20. SARAGEA, A.; MAXIMESCU, P. & MEITERT, E. — *Corynebacterium diphtheriae*: microbiological methods used in clinical and epidemiological investigations. In: BERGAN, T. & NORRIS, J.R. — *Methods in microbiology*. London, Academic press, 1979. v. 13, p. 61-176.
21. SIERRA, G. apud COWAN, S.T. & STEEL, R.J.². p. 167.
22. SONNENWIRTH, A.C. — Bacteriemia: alcance de problema. In: Sonnenwirth, A.C. — *Bacteremia: aspectos clínicos y de laboratorio*. Trad. do inglês por Editorial Médica Panamericana. Mexico, Panamericana, 1975. p. 15-28.
23. SOTTNEK, F.O. & MILLER, J.M. — *Isolation and identification of C. diphtheriae*. Atlanta, Center for Disease Control, 1980 (revised 1982). 14 p.
24. WILDFUHR, G. — Zur Frage der Bakteriemia in Beginn der Diphtherie. *Zentralbl. Bakteriol. I Abt Orig. A*, 54:14-7, 1949.

Recebido para publicação em 16 de maio de 1985.

IDENTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÁCIDOS BENZÓICO, CÍTRICO E LÁCTICO EM REFRIGERANTES, POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA *

Almir José RICCIARDI **
Jacob Fernando FERREIRA **
Nina Turko CARLUCCI **

RIALA6/600

RICCIARDI, A.J.; FERREIRA, J.F. & CARLUCCI, N.T. — Identificação simultânea dos ácidos benzóico, cítrico e láctico em refrigerantes, por cromatografia em camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45 (1/2):81-84, 1985.

RESUMO: Foi descrita a metodologia utilizada para detectar os ácidos benzóico, cítrico e láctico em refrigerantes comerciais. A cromatografia em camada delgada foi escolhida por ser um método simples e sensível, quando comparado com outros métodos analíticos.

DESCRIPTORIOS: acidulantes, conservadores em refrigerantes, detecção; refrigerantes, identificação dos ácidos benzóico, cítrico e láctico por cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

Algumas fábricas de refrigerantes estão alternando o uso de acidulante entre os ácidos cítrico e láctico, e empregando o ácido benzóico como conservador. Diversos métodos para identificação por cromatografia destes ácidos foram descritos^{3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14} e por nós testados, encontrando-se, assim, certa dificuldade em uma única análise para uma identificação simultânea dos três ácidos, com Rf bem distinguíveis.

Em 1979, LEVENBERGER et alii⁶ apresentaram um trabalho quantificando a sacarina e os ácidos benzóico e sórbico, por cromatografia líquida de alta resolução, mas, por ser este um método que exige um certo investimento, não foi testado, sendo nossa principal preocupação o desenvolvimento de uma técnica rápida e de baixo custo, o que foi conseguido através da cromatografia em camada delgada.

O método descrito permitiu a extração destes ácidos com acetato de etila e posterior identificação através da cromatografia em camada delgada, utilizando uma mistura de clorofórmio e ácido acético como fase móvel e uma mistura de indicadores como revelador, o que tornou possível a identificação destes

três ácidos nas concentrações comumente empregadas em refrigerantes².

O ácido benzóico pode ser determinado quantitativamente com adaptação deste método ao descrito nos métodos oficiais de análise da AOAC¹.

MATERIAL E MÉTODO

Material

No período de junho de 1982 a janeiro de 1985, foram examinadas noventa amostras de diversos refrigerantes (tabela p. seguinte), encaminhados pelos Centros de Saúde da Coordenadoria de Saúde da Comunidade da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, recolhidas nos supermercados e nos distribuidores de bebidas da região de Ribeirão Preto, SP.

Método

Extração: a 50 ml do refrigerante, após a eliminação do gás carbônico, foram adicionados 5 ml de HCl (1 + 3) e 25 ml de acetato de etila. Após agitação, em funil de separação, a camada superior de acetato de etila foi recolhida e concentrada até quase a secura, com aquecimento em banho-maria.

* Realizado no Laboratório I de Ribeirão Preto, SP, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

TABELA

Identificação dos ácidos benzóico, cítrico, láctico e fosfórico em amostras de refrigerantes analisados pelo Laboratório I de Ribeirão Preto, SP, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, no período de junho de 1982 a janeiro de 1985

Produto	N.º de amostras examinadas	Aditivos detectados							
		Ácido láctico		Ácido cítrico		Ácido benzóico		Ácido fosfórico	
		Número de amostras	Percentagem de amostras	Número de amostras	Percentagem de amostras	Número de amostras	Percentagem de amostras	Número de amostras	Percentagem de amostras
Refrigerantes de guaraná	25	4	16	20	80	24	96	5	20
Refrigerantes de maçã	13	4	31	9	69	12	92	6	46
Refrigerantes de frutas cítricas (limão, laranja e tangerina)	30	5	17	25	83	21	70	5	17
Refrigerantes de cola	12	0	0	3	25	7	58	12	100
Refrigerantes de "tutti-frutti"	10	3	30	8	80	9	90	0	0
Total	90	16	18	65	72	73	81	28	31

RICCIARDI, A.J.; FERREIRA, J.F. & CARLUCCI, N.T. — Identificação simultânea dos ácidos benzóico, cítrico e láctico em refrigerantes, por cromatografia em camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):81-84, 1985.

Cromatografia: em placas de camada delgada, com sílica gel G (STAHL tipo 60), soluções-padrões de ácido benzóico (0,01% p/v), ácido láctico (0,02% p/v) e ácido cítrico (0,03% p/v). Após esse processo, foi desenvolvido o cromatograma, utilizando-se como fase móvel clorofórmio e ácido acético glacial (27 + 3).

Como revelador foi empregada a solução vermelha de metila 0,12 g, verde de bromocresol 0,04 g e álcool etílico até completar 100 ml.

Os ácidos foram revelados como manchas vermelho-róseas sobre fundo roxo-avermelhado, com os seguintes Rf aproximados: ácido cítrico 0,0, ácido láctico 0,5 e ácido benzóico 1,0.

O ácido benzóico pôde ser quantificado adaptando-se este método ao descrito nos métodos oficiais de análise da AOAC¹ com as seguintes modificações: adição de 0,1 ml de extrato diluído com 5 ml de acetato de etila nas cromatoplacas, paralelamente com 0,1 ml de uma solução padrão de ácido benzóico a 0,1%. Desenvolver o cromatograma até uma altura de 10 cm, empregando-se como fase móvel clorofórmio e ácido acético glacial (27 + 3). Secar e raspar dois círculos de 2 cm de diâmetro centrados na linha de frente e perpendiculares aos pontos de aplicação da amostra e do padrão e transferir para tubos de centrifuga. Transferir para outro tubo de centrifuga um círculo com 2 cm de diâmetro, raspado da placa em um local onde não foi desenvolvido o cromatograma, para servir de branco. A cada tubo adicionar 10 ml de álcool etílico e agitar por trinta segundos. Centrifugar até o sobrenadante tornar-se límpido. Decantar o sobrenadante em uma cubeta e ler no espectrofotômetro a 272 nm. Calcular a concentração de ácido benzóico na amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a tabela, dos 90 refrigerantes analisados no período de junho de 1982 a

janeiro de 1985, pelo Laboratório I de Ribeirão Preto, SP, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 18% das amostras apresentaram ácido láctico, sendo que os refrigerantes de cola foram os únicos em que não foi encontrado este ácido; porém, constatou-se a presença de ácido fosfórico na totalidade destes refrigerantes. O ácido fosfórico, por ser um acidulante usado em refrigerantes, foi por nós identificado e encontrado em 31% de todas as amostras analisadas. Em mais de 15% dos refrigerantes rotulados como refrigerantes de frutas cítricas (como limão, laranja e tangerina), não foram adicionados sucos naturais, observação constatada pela ausência de betaina.

Analisando ainda a tabela, observamos que em 81% dos refrigerantes examinados foi constatada a presença de ácido benzóico, adicionado como conservador na forma de benzoato de sódio. Dentre as marcas de refrigerantes analisadas constatamos que um único fabricante não usa conservadores em seus produtos, utilizando-se do método da pasteurização.

Para verificar a sensibilidade do método, foram preparadas as seguintes soluções padrões: ácido benzóico a 0,01% p/v, ácido láctico a 0,02% p/v e ácido cítrico a 0,03% p/v, soluções estas com concentrações dez vezes menores dos que os valores máximos permitidos por lei (Decreto Federal n.º 55.871, de 26-3-1965²), identificando-se perfeitamente as respectivas manchas.

CONCLUSÃO

A cromatografia em camada delgada revelou ser um método eficiente para detectar os ácidos cítrico, benzóico e láctico em refrigerantes, por ser simples e sensível quando comparado com outros métodos analíticos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Paulo de Almeida Vidal pela colaboração prestada na realização deste trabalho.

RIALA6/

RICCIARDI, A.J.; FERREIRA, J.F. & CARLUCCI, N.T. — Simultaneous identification of benzoic acid, citric acid, and lactic acid in commercial soft drinks, by thin-layer chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):81-84, 1985.

ABSTRACT: A description is made of a procedure for the detection of citric acid, benzoic acid and lactic acid in commercial soft drinks. Thin-layer chromatography was found to be a simple and sensitive method compared with standard analytical methods.

DESCRIPTORS: acidifiers and preservatives in soft drinks, detection; soft drinks, identification of benzoic acid, citric acid and lactic acid by thin-layer chromatography.

RICCIARDI, A.J.; FERREIRA, J.F. & CARLUCCI, N.T. — Identificação simultânea dos ácidos benzóico, cítrico e láctico em refrigerantes, por cromatografia em camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):81-84, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington, DC, AOAC, 1984. p. 377-8.
2. BRASIL. Leis, decretos etc. — Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965. *Diário Oficial*, Brasília, 9 abr. 1965. Modifica o Decreto n.º 50.040, de 24 jan. 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterada pelo Decreto n.º 691, de 13 de março de 1962.
3. BRAUN, D. & GEENEN, H. — Dunnschicht-chromatographie von Carbonsauren. *J. Chromatogr.*, 7:56-9, 1962.
4. BUSH, M.L.; MONTGOMERY, R. & PORTER, W.L. — Identification of organic acids on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 24:489-91, 1952.
5. CHEFTEL, R.I. et alii apud LEDERER, E. & LEDERER, M. — *Chromatografia*. 2.^a ed. Buenos Aires, Ateneo, 1960. p. 214.
6. LEUENBERGER, U.; GAUCH, R. & BAUMGARTNER, E. — Determination of food preservatives and saccharin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 173:343-8, 1979.
7. LONG, A.G. — The separation of acids by paper partition chromatography. *J. Chem. Soc.*, 3:2197-201, 1951.
8. LUGG, J.W. & OVERELL, B.T. apud LEDERER, E. & LEDERER, M. — *Cromatografia*. 2.^a ed. Buenos Aires, Ateneo, 1960. p. 214.
9. MIKES, O. — *Laboratory handbook of chromatography methods*. London, Van Nostrand, 1966. p. 97.
10. OPIENSKA-BLAUTH, J.; SAKLAWSKA-SZYMONOWA, M. — Partition paper chromatography of some organic acids. *Nature*, 168:511-2, 1951.
11. RANDEKATH, K. — *Cromatografia de capa fina*. 2.^a ed. Bilbao, Urmo, 1965. p. 263-5.
12. RILEY, R.T. & MIX, M.C. — Thin-layer separation of citric acid cycle intermediates, lactic acid and the amino acids taurine. *J. Chromatogr.*, 189:286-8, 1980.
13. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.^a ed. São Paulo, 1976. p. 76.
14. STARK, J.B.; GOODBAN, A.E. & OWENS, H.S. — Paper chromatography of organic acids. *Anal. Chem.*, 23:413-5, 1951.

Recebido para publicação em 5 de agosto de 1985.

MÉTODOS PARA CONTROLE FÍSICO E BIOLÓGICO DE CATEGUTES SIMPLES. OBSERVAÇÃO SOBRE O EFEITO DO GLIOXAL *

Walter ALVES **
Otilia F. NOVO **
Ileana E. M. FONSECA **

RIALA6/601

ALVES, W.; NOVO, O.F. & FONSECA, I.E.M. — Métodos para controle físico e biológico de categutes simples. Observação sobre o efeito do glioxal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):85-87, 1985.

RESUMO: Foram desenvolvidos, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, um processo físico e um processo de digestão enzimática para verificar se a torção das fitas de colágeno, que constituem o categute, foi perfeita, pois a torção imperfeita diminui a resistência à tração e à digestão. O processo físico substitui com vantagens o método do tensímetro, pois realiza nós cirúrgicos em placa de borracha mole, de preferência de cor preta, previamente tratada, de consistência semelhante à do tecido muscular estriado. Os categutes, antes de passagem pelo exame físico, também sofreram tratamento (em solução salina a 7%). Este método é usado para verificar a qualidade do categute nas análises de orientação requeridas pelas empresas fabricantes, hospitais e para análises fiscais, que utilizam esse tipo de material cirúrgico. O controle de digestão enzimática de categutes, também desenvolvido no Instituto, tem por objetivo verificar se substâncias estranhas aos conservantes comuns são utilizadas nos categutes, a fim de aumentar sua resistência à tração e à digestibilidade.

DESCRITORES: categute, fios cirúrgicos, controle de qualidade; glioxal em fios de categute cirúrgico, efeitos *in vitro* na digestão e tração.

INTRODUÇÃO

Categutes cirúrgicos são fios preparados com colágeno de mamíferos sadios, principalmente de bovinos, e esterilizados^{1, 5, 6, 7}. O intestino deve chegar limpo, congelado ou salgado, ao local de fabricação de categutes. Quando salgado, deve ser liberado do sal por meio de banhos d'água.

Máquinas especiais separam o intestino grosso, que é desprezado, do intestino delgado, do qual será elaborado o categute. Estas máquinas também cortam o intestino delgado em tiras de 8 a 40 mm de largura e separam as tiras de acordo com o comprimento, sendo a seguir as mesmas submetidas ao processo de clareamento. Terminado o processo de clareamento, é retirada ao máximo a umidade das

tiras, em máquina que atua por compressão. Em seguida, é feita a torção, variando o número de tiras de acordo com o diâmetro desejado.

A torção é uma fase primordial na tecnologia de fabricação de categute, visto que implicará na resistência dos fios, na digestão *in vitro* ou no organismo. As máquinas modernas executam a torção em função do comprimento das tiras e números de fitas, em relação ao diâmetro desejado para o fio categute.

Após a feitura dos fios de categute, estes são levados à câmara de secagem, providas de ar condicionado, cuja temperatura é de 22-23°C. Retirados da câmara de secagem, os fios passam pelas operações de diametração, polimento e separação, de acordo com o diâmetro obtido^{2, 3, 4}.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

O método físico para verificação da torção de categutes é realizado para categutes prontos para o consumo (análises de orientação e fiscal), porém, pode ser aplicado no controle de qualidade na indústria logo após a fase de torção e, caso necessário, os lotes em elaboração poderão ter os defeitos de torção sanados antes da embalagem e esterilização dos mesmos^{9, 11}.

O categute simples, como os demais fios cirúrgicos absorvíveis, é classificado de acordo com o diâmetro, resistência à tração e ao tempo de digestão *in vitro*^{5, 6, 7, 8}.

A digestão artificial foi praticada pela primeira vez por Spalanzini, em recipientes fechados, utilizando sucos gástricos retirados de estômagos de aves¹. Posteriormente, foram realizadas digestões *in vitro*, com soluções ácidas como ácido clorídrico a 1:1000 ou ácido láctico e pepsina na proporção de 0,1 a 0,5 g por 1000. A digestão completa de albumina de ovos em grande quantidade, somente é possível pela eliminação de peptonas formadas durante o processo digestivo, por meio de diálise.

Na técnica empregada para digestão *in vitro* de categute simples consideramos a prova finda, em relação a este trabalho, quando de 95 a 98% de porção de categute utilizada estava digerida à temperatura de 37°C, que é a ideal para digestão.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

- Solução de cloreto de sódio a 7%
- Água destilada
- Tubo de borracha, mole, de 1 a 1,5 cm de espessura
- Fios de categute simples, com diâmetros variando de 27 a 31 e 57 a 60 centésimos de milímetro (200 amostras de cada)
- Agulhas cirúrgicas convencionais, de 6 cm de diâmetro
- Tubos de ensaio de 16 x 160 mm, com suportes
- Estufa a 37°C
- Solução de glioxal
 - solução aquosa de glioxal a 30%, 1 ml dietilaminoetanol, 1,25 ml
 - solução aquosa de benzoato de sódio a 20%, 2,0 ml
 - álcool isopropílico q.s.p, 500 ml
- Solução de pepsina, a 0,5%
 - pepsina, 5,0 g
 - ácido fórmico a 25%, 12 ml
 - água destilada q.s.p., 1.000 ml

Métodos

Torção — Manter a borracha submersa em água destilada por meia hora e os fios de categute em solução salina a 7%, tam-

bém por meia hora. A seguir, retirar os fios da solução, assim como a borracha da água, e praticar dois nós cirúrgicos na borracha.

Digestão *in vitro* — Em 10 séries de 10 tubos de ensaio colocar 5 cm de fios de categute de diâmetro entre 27 e 31 centésimos de milímetro, sendo um fio para cada tubo. Repetir as séries com fios de diâmetro de 57 a 60 centésimos de milímetro. A seguir, colocar 10 ml de solução de pepsina, em cada tubo, precisamente aquecida a 37°C, e encubar em estufa, também à temperatura de 37°C, após tamponar com rolha de borracha. Observar as fases de digestão dos fios que inicialmente se mantêm filiformes e a seguir dividem-se em tiras, sendo posteriormente absorvidas.

Executar as provas descritas para digestão, com fios idênticos aos dos dois lotes anteriores, porém tratados por solução de glioxal, por uma semana.

RESULTADOS

Dos quatrocentos fios de categute testados no exame físico, 95% dos que sofreram torção adequada permaneceram intactos. Aqueles cuja torção foi imperfeita deixaram resíduos semelhantes a pêlos e fiapos na borracha e foram rejeitados.

Na digestão *in vitro* tivemos os seguintes tempos médios:

40 horas: 100 fios de diâmetro de 27-31 centésimos de milímetro

62 horas: 100 fios de diâmetro de 57-60 centésimos de milímetro

Os fios tratados com solução de glioxal tiveram os seguintes tempos médios:

60 horas: 100 fios de diâmetro de 27-31 centésimos de milímetro

98 horas: 100 fios de diâmetro de 57-60 centésimos de milímetro

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O método físico foi elaborado para substituir o tensímetro, aparelho importado e de difícil aquisição, e os resultados obtidos revelaram segurança e precisão.

Comparando os resultados da digestão *in vitro* dos fios de categute simples, aprovados no teste físico e não tratados pela solução de glioxal, com aqueles tratados, observamos substancial aumento do tempo médio de digestão *in vitro*, o que ocorrerá também *in vivo*.

Concluimos que fios de categute simples, não tratados pelo método universal de cromação^{9, 10, 11}, podem apresentar, com qualidade idêntica de torção verificada no exame físico, tempos de digestão maiores através de tratamento químico, como com glioxal, no caso em tela, que bloqueia e retarda a ação enzimática que, por sua vez, influencia negativamente o acompanhamento pós-operatório por parte do

cirurgião, visto que a absorção do categute será mais demorada do que o esperado.

Quando um categute simples apresentar tempo de digestão superior a outro categute idêntico, tomado como padrão, devemos estudá-lo a fim de verificar se foi tratado ou embalado com substância química

que possa causar irritação de tecidos, peles ou mucosas, ou mesmo rejeição *in vivo*, que o glioxal³, nas proporções usadas neste trabalho, não apresentou irritação na pele de animais de teste, porém, em concentrações maiores, pode ocorrer tal irritação.

RIALA6/601

ALVES, W.; NOVO, O.F. & FONSECA, I.E.M. — Methods for physical and chemical control of simple catgut samples. Observations on the effect of glioxal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):85-87, 1985.

ABSTRACT: A physical method and an enzymatic digestion method were devised for verifying whether the torsion of collagen fibers composing catgut was satisfactory. In fact, improper torsion decreases the resistance to traction and to digestion. The physical method seems to be better than use of the tensiometer and it consists of making surgical knots on a plate of soft rubber (preferably black and previously treated) which has consistency similar to that of striated muscle. Before undergoing physical examination, catguts are previously treated in 7% saline solution. This method has been employed for quality control according to the orientation methods required by manufacturers and hospital, and also by the public-health administration. The catgut and its *in vitro* conducted for controlling the enzymatic digestion reproduces *in vivo* digestion of presence of foreign substances which are not present in the common conservatives but which may be used for increasing the resistance to traction and digestion.

DESCRIPTORS: catgut, surgical thread, quality control; glioxal in catgut thread, effects *in vitro* digestion and torsion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLOCK, S.S., ed. — *Disinfection, sterilization, and preservation*. 2nd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. p. 542-61.
2. BRITISH Pharmacopoeia, 1963, published under the direction of the General Medical Council... official from January 1964. [10.^a ed.] London, General Medical Council, c1963. p. 963-4.
3. BULLOCH, W.; PAMPITT, L.H. & BUSHILL, J.H. — *The preparation of catgut for surgical use*. London, H.M. Stationery off., 1929. p. 101-36.
4. FANDRE, A. — *Le catgut; les ligatures et les sutures chirurgicales a travers les ages*. Paris, Masson, 1944. p. 501-36.
5. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.^a ed. São Paulo, Siqueira, 1959. p. 464-7.
6. FARMACOPÉIA brasileira. 3.^a ed. São Paulo, Andrei, 1977. p. 898-902.
7. HEDON, E. — *Precis de physiologia*. 11.^a ed. Porto Alegre, Globo, 1944. p. 429-30.
8. The MERCK index, an encyclopedia of chemicals and drugs. 8th ed. Rahway, N.Y., Merck, 1968. p. 502-50.
9. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD — *Farmacopea internacional*. 3.^a ed. Ginebra, OMS, 1980. p. 199-200.
10. SYKES, G. — *Disinfection and sterilization*. 2nd ed. London, E. & F.N. Spon, 1965. p. 408.
11. The UNITED STATES pharmacopeia. Rockville, Md., USP, 1980. p. 759-60.

Recebido para publicação em 5 de agosto de 1985.

SUJIDADES EM FARINHAS DE TRIGO, MANDIOCA, MILHO, E EM FUBÁ DE MILHO *

Claydes de Quadros ZAMBONI **
Regina M. M. Silva RODRIGUES **
Mônica Arcon BATISTIC **
Helena Ide ALVES **
Nazareth SPITERI **
Márcia Bittar ATUI **

RIALA6/602

ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES, R.M.M.S.; BATISTIC, M.A.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & ATUI, M.B. — Sujidades em farinha de trigo, mandioca, milho e em fubá de milho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):89-93, 1985.

RESUMO: Foram analisadas 1.045 amostras de farinhas dos tipos trigo, mandioca, milho e fubá de milho, de março de 1980 a outubro de 1985, com a finalidade de verificar, através da pesquisa de sujidades pelo método de digestão com pancreatina, as condições higiênicas desses alimentos. Concluiu-se que 43% das amostras de farinha de trigo, 2% das de farinha de mandioca, 9% das de farinha de milho e 8% das de fubá de milho estavam em condições higiênicas insatisfatórias e 4% das de farinha de trigo, 12% das de farinha de mandioca, 5% das de farinha de milho e 3% das de fubá de milho estavam impróprias para o consumo, de acordo com critérios preestabelecidos de limite de tolerância de defeitos. Foi sugerida modificação no Código Alimentar Brasileiro, substituindo a exigência de ausência de sujidades para uma tolerância de até 10, quando se tratar de fragmentos de insetos.

DESCRITORES: farinhas, detecção microscópica de impurezas; farinha de trigo; farinha de mandioca; farinha de milho; fubá de milho.

INTRODUÇÃO

As farinhas são matérias-primas de uma grande quantidade de alimentos processados, como massas alimentícias, pães, bolos, biscoitos e outros produtos de confeitaria. Algumas são consumidas *de per si* ou como ingredientes de vários alimentos preparados no lar. Portanto, se elas estiverem contaminadas com sujidades, serão um dos veículos desse material estranho ao alimento.

Verificamos que as diversas farinhas apresentavam sujidades, como fragmentos de insetos, insetos vivos e mortos, pelos de roedores, ácaros etc., que caracterizam produtos em condições higiênicas insatisfatórias ou impróprias para o consumo.

Resolvemos, então, elaborar este trabalho com o intuito de verificar as condições higiê-

nicas das farinhas de trigo, milho, mandioca e de fubá de milho, a fim de podermos sugerir possíveis modificações na legislação pertinente, visto que as indústrias que utilizam essas matérias-primas, principalmente a farinha de trigo, alegam impossibilidade de obtenção de farinhas isentas de sujidades, como exigido pelas normas legais vigentes^{3, 7}.

MATERIAIS E MÉTODO

Foram analisadas 1.045 amostras de farinhas assim distribuídas: 612 amostras de farinha de trigo, 100 amostras de farinha de milho, 130 amostras de farinha de mandioca e 173 amostras de fubá de milho, colhidas pela Divisão de Alimentação Pública do Estado de São Paulo, nos vários supermercados e mercearias da Capital e do

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Interior do Estado de São Paulo e algumas amostras de farinha de trigo enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise de orientação pelos moinhos, de 1980 a 1985.

O método utilizado foi o da digestão com pancreatina, segundo "Association of Official Analytical Chemists" e "American Association of Cereal Chemists", com algumas modificações 1, 2, 3, 4, 5.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise de sujidades em farinhas de trigo, mandioca, milho e em fubás de milho encontram-se apresentados na tabela 1.

Os insetos, fragmentos de insetos e os produtos do metabolismo dos insetos (ovos e larvas) eram originários de espécies próprias de produtos armazenados (*Tribolium sp*, *Rhyzopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus sp*, *Ephestia sp*, *Citotroga sp*) além de oportunistas (*Blatta sp*). Já os pêlos de roedores eram de rato ou camundongo e os ácaros do gênero *Tyroglyphus* 4.

Fazendo uma comparação entre as farinhas, tendo em vista os resultados obtidos, vamos considerar:

- em condições higiênicas satisfatórias, quanto ao exame microscópico, a unidade que apresente ausência de sujidades ou em que o número de fragmentos de insetos seja inferior a 10;
- em condições higiênicas insatisfatórias, quanto ao exame microscópico, a unidade que apresente as seguintes sujidades: fragmentos de insetos (mais de 10), larvas de insetos mortas e insetos mortos;
- imprópria para o consumo, a unidade que apresente insetos vivos, ácaros vivos e mortos, pêlos de roedores, ovos, larvas e insetos vivos, bolor, ou a combinação dessas sujidades e parasitos.

De acordo com o critério acima exposto, classificamos as unidades das quatro farinhas como: em condições higiênicas satisfatórias, insatisfatórias, ou impróprias para o consumo. Os resultados desta classificação estão representados na tabela 2, na página 91.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A vista dos resultados obtidos verifica-se que, das 1.045 amostras analisadas, apro-

ximadamente 43% da farinha de trigo, 2% da farinha de mandioca, 9% da farinha de milho e 8% do fubá de milho estavam em condições higiênicas insatisfatórias e 4% da farinha de trigo, 12% da farinha de mandioca, 5% da farinha de milho e 3% do fubá de milho estavam impróprios para o consumo, segundo os critérios de tolerância considerados.

Sabemos que as farinhas podem ser contaminadas por pragas do campo ou dos armazéns. Como as sujidades encontradas eram originárias de pragas de produtos armazenados, podemos concluir que os resultados obtidos são devidos principalmente à contaminação nos armazéns. Essa contaminação pode destruir alguns nutrientes do alimento ou alterar o seu sabor, aroma, aparência ou outras características, o que resulta na depreciação do produto.

Com relação à farinha de trigo, a matéria-prima originária de outros países (Canadá, França, Argentina e Estados Unidos) é transportada em porões de navios, sendo um dos fatores que contribui para a contaminação. O trigo nacional fica armazenado um certo tempo em silos, até ser distribuído aos moinhos, facilitando, assim, o ataque por pragas de armazéns. Outro exemplo é o modo descuidado como o cereal é manuseado, que concorre gravemente para a infestação.

Pelos motivos expostos, podemos concluir que, se não for feita uma boa limpeza inicial no trigo em grão, fatalmente a farinha apresentará sujidades. Assim, o controle de qualidade desse produto deve estar ligado a boas condições de higiene, a fim de se obter uma barreira sólida de defesa contra a penetração de pragas.

Quanto às sugestões para possíveis alterações na legislação em vigor referente às farinhas, que atualmente exige ausência de sujidades, poderíamos sugerir uma tolerância de até 10 fragmentos de insetos por 50 gramas, em qualquer tipo de farinha, visto que a quantificação de fragmentos de insetos é arbitrária, pois um único inseto tanto pode ser fragmentado em vários pedaços minúsculos, quanto em alguns de maior tamanho.

A ausência de sujidades deve continuar a ser exigida com relação à presença de pêlos de roedores, porque estes evidenciam contaminação do alimento com excrementos de roedor, que são fontes de bactérias patogênicas. Da mesma forma deve ser exigida ausência de parasitos, como ácaros e insetos vivos, assim como larvas vivas e mortas, porque, além de destruir o produto e alterarem os caracteres organolépticos, estes parasitos podem funcionar como alérgenos 6.

ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES; R.M.M.S.; BATISTIC, M.A.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & ATUI, M.B. — Sujidades em farinha de trigo, mandioca e milho e em fubás de milho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45 (1/2):89-93, 1985.

TABELA 1

Sujidades em farinhas de trigo, mandioca, milho e em fubás de milho

Sujidades		Amostras		Farinha de trigo		Farinha de mandioca		Farinha de milho		Fubá de milho	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%		
Fragmentos de insetos	0 a 1	448	73,20	103	79,23	70	70,00	121	69,94		
	2 a 5	21	3,43	4	3,07	8	8,00	7	4,05		
	6 a 10	74	12,10	5	3,85	8	8,00	31	17,92		
	+ de 10	40	6,55	1	0,77	7	7,00	4	2,31		
Fragmentos de insetos e pêlos de roedores		11	1,80	7	5,38	0	0,00	3	1,73		
Insetos vivos		6	0,98	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
Insetos mortos		2	0,32	1	0,77	0	0,00	0	0,00		
Insetos vivos e mortos		1	0,16	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
Insetos mortos e fragmentos de insetos		1	0,16	0	0,00	1	1,00	1	0,58		
Larvas de insetos vivas		0	0,00	2	1,54	0	0,00	0	0,00		
Ovos e larvas de insetos vivas		0	0,00	1	0,77	0	0,00	0	0,00		
Larvas de insetos mortas		0	0,00	0	0,00	1	1,00	2	1,15		
Larvas de insetos vivas e mortas		0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,58		
Fragmentos de insetos e larvas mortas		0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,58		
Fragmentos de insetos e bolor		0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,58		
Insetos mortos, frag. de insetos e ácaros mortos		0	0,00	1	0,77	0	0,00	0	0,00		
Frag. de insetos, pêlos de roedores, ácaros mortos e larvas de insetos mortas		0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,58		
Insetos mortos, frag. de insetos e pêlos de roedores		0	0,00	1	0,77	0	0,00	0	0,00		
Fragmentos de insetos e ácaros mortos		0	0,00	0	0,00	2	2,00	0	0,00		
Ácaros vivos		1	0,16	1	0,77	0	0,00	0	0,00		
Pêlos de roedores		7	1,14	3	2,31	2	2,00	0	0,00		
Total		612	100,00	130	100,00	106	100,00	173	100,00		

TABELA 2

Classificação das amostras de farinhas de trigo, mandioca, milho e de fubá de milho, de acordo com a ausência, presença e tipo de sujidades

Amostras	Farinha de trigo	Farinha de mandioca	Farinha de milho	Fubá de milho
	n.º (%)	n.º (%)	n.º (%)	n.º (%)
em condições higiênicas satisfatórias	543 (88,72)	112 (86,15)	86 (86,00)	159 (91,90)
em condições higiênicas insatisfatórias	43 (7,03)	2 (1,54)	9 (9,00)	8 (4,63)
impróprias para o consumo	26 (4,25)	16 (12,31)	5 (5,00)	6 (3,47)
Total	612	130	100	173

RIALA6/602

ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES, R.M.M.S.; BATISTIC, M.A.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & ATUI, M.B. — Filth in wheat flour, cassava flour, corn flour and corn meal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):89-93, 1985.

ABSTRACT: Samples of four types of flour, 612 samples of wheat flour, 130 of cassava flour, 100 of corn flour, and 173 of corn meal were examined for sanitary quality. Recovery of light filth such as insect fragments, whole insects, mites, rodent hair, was made by the pancreatin digestion method. It was found that 43% of the wheat flour samples, 2% of the cassava flour samples, 9% of the corn flour samples, and 8% of the corn meal samples were in unsanitary conditions; while 4% of the wheat flour samples, 12% of cassava flour samples, 5% of corn flour samples and 3% of the corn meal samples were unfit for human consumption. It is suggested that the Alimentary Codex be modified to tolerate up to 10 insect fragments per 50 g of flour.

DESCRIPTORS: flours, microscopical filth detection; wheat flour; cassava flour; corn flour; corn meal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS — *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8th ed. St. Paul, Minnesota, AACC, 1983. v. 1 (AACC method 28-31).
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th ed. Washington, DC, AOAC, 1980. p. 793. (Seccion 4.055).
3. BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução n.º 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11.506-7. Aprova as Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas)...
4. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION — *Training manual for analytical entomology in the food industr*, edited by J.R. Gorham. Washington, DC, FDA, 1977. p. 78-84. [FDA tech. bull. n.º 2].

ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES, R.M.M.S.; BATISTIC, M.A.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & ATUI, M.B. — Sujidades em farinha de trigo, mandioca e milho e em fubás de milho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):89-93, 1985.

5. KITELEY, E.J. — Some collaborative investigations on methods for isolating extraneous material from white flour. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 37:139-47, 1955.
6. NICHOLSON, J.F. — Report on extraneous materials in backed product cereals and egg products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 32:322-24, 949.
7. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. — Decreto n.º 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978, p. 17. (NTA 34, NTA 35). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
8. TERBUSH, L.E. — The medical significance of mites of stored food. *FDA by-lines*, 2:57-70, 1972.
9. ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. — Comparação entre os métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):13-20, 1985.

Recebido para publicação em 4 de outubro de 1985.

INDICE DE AUTOR

ALVES, H.I., 21, 27, 89
ALVES, W., 85
ANDRIGHETTI, H., 1
ATUI, M.B., 89
BARRETTO, H.H.C., 43
BATISTIC, M.A., 61, 89
BRANDILEONE, M.C.C., 73
CARLUCCI, N.T., 81
CAVALCANTE, Z.M.O., 37
DUTRA, A.P., 31
EBNER FILHO, W., 31
ERLICH, R.B., 65
FERRANDEZ, C.A., 65
FERREIRA, J.F., 81
FONSECA, I.E.M., 85
FUNATSU, M.K., 65
GODANO, A., 37
INOMATA, O.N.K., 43
ISHIDA, M.A., 53
ISHIY, W.C., 31
KAWARABAYASHI, M., 37
KIMURA, R.T., 31
LAJOLO, F., 1
LARA, W.H., 43
LOPES, D.M., 37
MELHEM, M.S.C., 37
MELLES, C.E.A., 73
MONTAGNINI, M.L., 65
NOVO, O.F., 85
OGA, S., 1
OGAWA, C.A., 65
PAES, R.A.P., 65
PAULA, M.D.N., 73
PIRES, R.B.R., 37
RIBEIRO, M.A., 37
RICCIARDI, A.J., 81
ROCHA, S.M., 31
RODRIGUES, R.M.M.S., 13, 27, 89
SACCHI, C.T., 73
SAKAKIBARA, S., 53
SILVA, E.A.S., 31
SPITERI, N., 21, 27, 89
TAKEDA, A.K., 31
TATUTA, C., 31
TONDELLA, M.L.C., 73
VIANNA, T.H.S., 37
YABIKU, H.Y., 1
YAMAGUCHI, A., 53
YOKOTA, Y., 53
ZAMBONI, C.Q., 13, 21, 27, 61, 89

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Ácido benzóico
em refrigerantes, determinação cromatogr. camada delgada, 81
- Ácido cítrico
em refrigerantes, determinação cromatogr. camada delgada, 81
- Ácido láctico
em refrigerantes, determinação cromatogr. camada delgada, 81
- Acidulantes
em refrigerantes, detecção, 81
- Anticorpos
contra o vírus da influenza, tipos A, B
frequência em habitantes da cidade de São Paulo, BR, 1982, 53
na hepatite B, 31
- Antígeno
na hepatite B, 31
- Asaronas
 α , β -asaronas
atividade mutagênica
em *Salmonella typhimurium*, 1
efeitos tóxicos
em camundongos, 1
em embriões de galinha, 1
- Biscoitos
"Cream-Cracker", "Maizena"
impurezas em, análise microscópica, 61
- Cálamo, óleo
veja Óleo de cálamo
- Camundongos
desenvolvimento ponderal, 65
- Categute, fios cirúrgicos
controle de qualidade, 85
glioxal, efeitos *in vitro* na digestão e tração de, 85
- Chocolate em pó
cascas de sementes de cacau, detecção em, método microscópico de contagem de vasos espiralados, 21
- Conservadores
em refrigerantes, detecção, 81
- Corynebacterium diphtheriae*
isolamento de sangue humano, 73
- Escherichia coli*
endotoxina, 65
- Farinha de mandioca
impurezas em, detecção microscópica, 89
- Farinha de milho
impurezas em, detecção microscópica, 89
- Farinha de rosca
impurezas em, detecção microscópica, 13
- Farinha de trigo
impurezas em, detecção microscópica, 27
partículas metálicas em, detecção microscópica, 27
- Fubá de milho
impurezas em, detecção microscópica, 89
- Glioxal
em fios de categute
efeitos *in vitro* na digestão e tração, 85
- Hepatite B
anticorpos, 31
antígeno, 31
- Leite
resíduos de pesticidas organoclorados em, determinação, 43
- Leptospirose humana
imunodiagnóstico
prova de hemaglutinação passiva, 37
- Óleo de cálamo
atividade mutagênica
em *Salmonella typhimurium*, 1
efeitos tóxicos
em camundongos, 1
em embriões de galinha, 1
- Pesticidas organoclorados, resíduos
em leite, determinação, 43
- Refrigerantes
acidulantes em, detecção, 81
conservadores em, detecção, 81
- Sangue
isolamento de *Corynebacterium diphtheriae*, 73
- Timo, morfologia, 65
- Vírus da influenza, tipos A, B
anticorpos contra, frequência em habitantes da cidade de São Paulo, BR, 1982, 53

SUBJECT INDEX

- Acidifiers
 in soft drinks, determination
 thin-layer chromatogr., 81
- Antibody
 against influenza virus, types A, B
 frequency in São Paulo City, BR,
 1982, 53
 in hepatitis B, 31
- Antigen
 in hepatitis B, 31
- Asarones
 α , β -asarone
 mutagenic activity
 in *Salmonella typhimurium*, 1
 toxic effects
 in chick embryos, 1
 in mice, 1
- Benzoic acid
 in soft drinks, determination, 81
- Biscuits
 cream-cracker, "Maizena"
 filth in, microscopical detection, 61
- Blood
 isolation of *Corynebacterium diphtheriae*, 73
- Calamus oil
 mutagenic activity
 in *Salmonella typhimurium*, 1
 toxic effects
 in chick embryos, 1
 in mice, 1
- Cassava flour
 filth in, microscopical detection, 89
- Catgut, surgical thread
 glioxal, effects in vitro digestion and
 torsion of, 85
 quality control, 85
- Chocolate, powdered
 cocoa-seed shells detection
 microscopical spiral-vessel count
 method, 21
- Citric acid
 in soft drinks, determination, 81
- Corn flour
 filth in, microscopical detection, 89
- Corn meal
 filth in, microscopical detection, 89
- Corynebacterium diphtheriae*
 isolation from human blood, 73
- Escherichia coli*
 endotoxin, 65
- Glioxal
 in catgut thread, effects in vitro dig-
 gestion and torsion, 85
- Hepatitis B
 antigen, 31
 antibody, 31
- Influenza virus, types A, B
 antibodies, frequency
 in inhabitants of São Paulo, BR,
 1982, 53
- Lactic acid
 in soft drinks, determination
 thin-layer chromatogr., 81
- Leptospirosis, human
 immunodiagnosis
 passive hemagglutination test, 37
- Mice
 weight development, 65
- Milk
 organochlorine pesticide residues in,
 determination, 43
- Oils
 calamus oil, 1
- Organochlorine pesticide residues
 in milk, determination, 43
- Preservatives
 in soft drinks, detection, 81
- Soft drinks
 acidifiers in, detection, 81
 preservatives in, detection, 81
- Surplus-bread flour
 filth, microscopical analysis, 13
- Thymus, morphology, 65
- Wheat flour
 filth in, microscopical detection, 27
 metallic particles in, microscopical
 detection, 27

