



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

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN0073-9855

RIALA6

VOLUME 47

NÚMERO 1/2

JUN./DEZ., 1987



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

EDITOR RESPONSÁVEL

LUIZ SEBASTIÃO PRIGENZI
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

PEDRO PAULO CHIEFFI, *Presidente*
ELISEU ALVES WALDMAN
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO
JOSÉ EDUARDO TOLEZANO
JOSÉ LEOPOLDO FERREIRA ANTUNES
MYRNA SABINO
NEUS PASCUET PREGNOLATTO
ODAIR ZENEBON
ROBERTO A. PINTO PAES
VENÂNCIO A. FERREIRA ALVES
SARA TETNER BURSTEIN, *Secretária*

REDATORA-SECRETÁRIA

DEBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

Endereço/*address*

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

Publicação semestral/*Bi-annual publication*

Solicita-se permuta/*Exchange desired*

(*)

<p>REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (Secretaria de Estado da Saúde) São Paulo, SP — Brasil, 1941 —</p>	
<p>1941-1986, 1-46 1987, 47(1/2)</p>	
<p>ISSN 0073-9855 RIALA6</p>	<p>○</p>
<p>CDD 18 614.07205</p>	

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

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

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 47(1/2):1-119, jun./dez., 1987.

SUMÁRIO/CONTENTS

- 619 Pesquisa de sais de sulfito em carnes comercializadas a varejo na região metropolitana de São Paulo
Search for sulphite salts in meat products retailed in metropolitan São Paulo
Mário TAVARES; Cássia Maria LOBANCO; Luz Marina TRUJILLO; Márcia Regina PENNACINO & Maria Célia Barreiros MARTINS 1-4
- 620 Determinação de nitritos e nitratos em lingüiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo
Determination of nitrites and nitrates in sausage and other preserved meats retailed in Metropolitan São Paulo
Mário TAVARES; Ana Maria ZANELATTO; José Byron de CARVALHO; Liliana Brancacio BACETTI; Mickiko Y. TAKAHASHI & Sabria AUED 5-10
- 621 Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil
Pulmonary disease due to Mycobacterium kansasii in São Paulo, Brasil
Eny Aparecida Matheus da SILVA; José Benício Nunes de MIRANDA; Lucilaine FERRAZOLI; Marcia Evangelina ALGE; Regina Ruivo Ferro e SILVA; Terumi O. FUZIHARA & Moisés PALACI 11-17
- 622 Níveis de pesticidas organoclorados em soro sanguíneo de pessoas expostas à doença de Chagas no Brasil
Levels of hexachlorocyclohexane (HCH) in exposed people from a Chagas disease area in Alcandia, Go, Brazil
Walkyria H. LARA; Heloísa H.C. BARRETTO & Odete N.K. INOMATA 19-24
- 623 Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas naturais
Comparative study of methods for determination of nitrate in water from wells drilled in metropolitan São Paulo
Jorge José do Vale OLIVEIRA; Maria Isabel VALLILO; Nilva Aparecida R. FEDRO & Odair ZENEON 25-30
- 624 Estudo bacteriológico de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1980 a 1986
Bacteriological study of strains of Corynebacterium diphtheriae isolated in São Paulo State, during the period 1980-1986.
Cláudio Tavares SACCHI; Solange Rodrigues RAMOS; Carmo Elias Andrade MELLES; Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE; Maria Lúcia Cecconi TONDELLA & Augusto de Escragnole TAUNAY 31-37
- 625 Introdução da técnica espectrofotométrica na detecção da cafeína em guaraná
Use of the spectrophotometric method in the caffeine determination in guarana
Mariângela T. AURICCHIO; Mônica A. BATISTIC & Vânia R. HOPPEN 39-44

626	<i>Chlamydia trachomatis</i> em esfregaços cervicais e vaginais: importância do método de Papanicolôu no rastreamento em grandes populações <i>Chlamydia trachomatis in smears of the cervix uteri and vagina. The importance of Papanicolaou staining in the screening of large population groups</i> Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA; Maria José CAVALIERE; Lai Wun Song SHIH & Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO	45-50
627	Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano <i>Cell culture for detecting toxicity of biocompatible materials</i> Aurea Silveira CRUZ; Kátia Moreira CUPPOLONI; Clélia H.O. MARTINEZ & Luis F. Salles GOMES	51-57
628	Estudo da suscetibilidade da <i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848) de Taubaté, S.P., à infecção por cepa S.J. de <i>Schistosoma mansoni</i> do Vale do Paraíba, S.P. <i>Comparative susceptibility of Biomphalaria straminea (Dunker, 1848) and B. tenagophila (d'Orbigny, 1835) from Taubaté (state of São Paulo, Brazil) to infection with the strain of Schistosoma mansoni from Vale do Paraíba (state of São Paulo)</i> Luiz dos SANTOS; Gisela R.A.M. MARQUES; Ioli B. COSTA; Cristiano C.A. MARQUES & Maristela R.O.M. GOMES	59-63
629	Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializados no Brasil <i>Levels of preservative substances intentionally added to natural fruit juices sold in Brazil</i> Helena Yuco YABIKU; Mickiko Y. TAKAHASHI; Maristela S. MARTINS; Ronaldo HEREDIA & Odair ZENEBO	65-75
630	Detecção de rotavírus e adenovírus na Grande São Paulo no período 1984-1986. Estudo eletroforético do genoma dos rotavírus <i>Rotavirus and adenovirus detection in the Greater São Paulo, in 1984-1986. Electrophoretic study of the rotavirus genome</i> Maria do Carmo S.T. TIMENETSKY; Denise de Sousa LAZAROTTI; Jonas KISELLIUS & Helio G. PEREIRA	77-85
631	Óleos naturais: verificação de sua qualidade por cromatografia em fase gasosa <i>Search for frauds in commercial natural oils by gas-liquid chromatography</i> Elza S. Gastaldo BADOLATO; Franca Durante de MAIO; Leda C.A. LAMARDO & Odair ZENEBO	87-95
632	Estudo sobre anticorpos heterófilos desenvolvidos na mononucleose infecciosa <i>Study on heterophile antibodies in infectious mononucleosis</i> Adelaide José VAZ; Eide Dias CAMARGO; Maria Luiza ALDRIGUI; Marcos Vinícius da SILVA; Ana Maria Carvalho de SOUZA & Mirthes UEDA	97-102
633	Enterobactérias dos gêneros <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> e <i>Serratia</i> isoladas de líquido cefalorraquidiano <i>Enterobacteria of genera Klebsiella, Enterobacter and Serratia isolated from cerebrospinal fluid</i> Ilka Maria LANDGRAF; Tânia Maria Ibelli VAZ; Kinue IRINO; Maria de Fátima Paiva VIEIRA & Carmo Elias Andrade MELLE	103-107
634	Sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica isolada de coproculturas, no período de 1983 a 1987, no Município de São Paulo <i>Enterotoxigenic Escherichia coli serogroups in isolates from stool cultures made from 1983 to 1987 in the Municipality of São Paulo, Brazil</i> Ângela Maria Girardi DIAS; Glória Regina Freitas do VALLE; Maria Aidê Mitico Fukushima KATO; Lêda Kano NAKAHARA & Elena KANO	109-113
	ÍNDICE DE AUTOR	115
	ÍNDICE DE ASSUNTO	117
	SUBJECT INDEX	119

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

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

Texto

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

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

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

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

UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS — Deverão ser usadas somente as unidades legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução nº 01/82 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Diário Oficial*, Brasília, 10 maio 1982. Seção 1, pt. 1, 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
0,000 | } quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.; |
| X | |

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*²; 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, 1963-65. 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.; PESSÔA, 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 ator, 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 50 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 ou estrangeiros.

PESQUISA DE SAIS DE SULFITO EM CARNES COMERCIALIZADAS A VAREJO NA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO*

Mário TAVARES**
Cássia Maria LOBANCO**
Luz Marina TRUJILLO**
Márcia Regina PENNACINO**
Maria Célia Barreiros MARTINS**

RIALA6/619

TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; TRUJILLO, L.M.; PENNACINO, M.R. & MARTINS, M.C.B. — Pesquisa de sais de sulfito em carnes comercializadas a varejo na região metropolitana de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):1-4, 1987.

RESUMO: Visando a pesquisa de adição fraudulenta de sais de sulfito em produtos cárneos, foram analisadas 167 amostras, a maioria de carne pré-moída (não moída na frente do consumidor), crua, e as demais de carne crua em pedaços ou em hambúrgueres, comercializadas a varejo na Região Metropolitana de São Paulo. Utilizando o método qualitativo da solução de cloreto de bário, constatou-se que 66 amostras (40%) apresentaram resultado positivo para sais de sulfito, expressos em dióxido de enxofre. Com este levantamento, os autores pretendem auxiliar os órgãos fiscalizadores da Saúde Pública, particularmente o DECON, no controle efetivo deste tipo de fraude, em São Paulo.

DESCRITORES: carne bovina (crua), análise; sais de sulfito em carne bovina, detecção; alimentos, fraudes.

INTRODUÇÃO

Os derivados de enxofre formadores de SO_2 , como os sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos, são usados como conservadores em determinados tipos de alimento^{4,11}, numa concentração máxima estabelecida pelas normas legais⁶. No caso de produtos cárneos, a legislação brasileira não permite o emprego de sais de sulfito⁶.

Na tecnologia de alimentos, estes sais, por suas propriedades antioxidantes^{11,12,19} e antimicrobianas^{1,11,12,19}, são empregados, respectivamente, para evitar o escurecimento enzimático e não enzimático^{12,19} e o crescimento de microrganismos indesejáveis, sendo mais efetivos sobre as bactérias do que sobre os bolores e leveduras¹¹.

Apesar de o mecanismo de ação dos sais de sulfito como agente antimicrobiano não estar totalmente definido, três possibilidades têm sido sugeridas para explicá-lo, baseadas em investigações

experimentais. São elas: efeito do pH, poder redutor, e ação direta sobre o sistema enzimático dos microrganismos¹³. Tais propriedades podem justificar a utilização fraudulenta dos derivados de enxofre em produtos cárneos, fundamentalmente para promover uma coloração avermelhada, típica da carne fresca^{10,14}, e mascarar uma possível decomposição da mesma por agentes microbianos¹⁰.

A manutenção, assim como a restauração da cor avermelhada da carne, deve-se à sua propriedade redutora, agindo sobre o mecanismo de oxidação da mioglobina. Ambos os pigmentos, mioglobina e oximioglobina, possuem em sua estrutura um átomo de Fe^{2+} . Na mioglobina, este átomo de ferro pode oxidar-se e passar para a forma de Fe^{3+} . A mioglobina é transformada no pigmento metamioglobina de coloração vermelho-amarronzada^{5,7}. Esta mudança indica um comprometimento na qualidade da carne. Desta forma, a cor natural da carne não pode ser restaura-

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 9º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 1986.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

da, a não ser por medidas especiais⁵, como no caso do uso de sais de sulfito.

Com relação à ação antimicrobiana, sabe-se que as carnes são bastante suscetíveis ao ataque de microrganismos, especialmente as carnes moídas, por causa da umidade e da grande superfície de contato adquirida na moagem⁹. Este problema pode ser agravado por falhas na higiene dos manipuladores e dos aparelhos de moagem (resíduos de operação anterior)⁸, ou ainda pela moagem não efetuada "na presença do consumidor"¹⁸.

Outro ponto a ser considerado é o tratamento das carnes com estes aditivos, que causam a destruição da tiamina, elemento essencial da dieta humana, nelas existentes, comprometendo, assim, o valor nutritivo do produto^{3,12,14}. O comprometimento da atividade biológica da vitamina B₁, deve-se a uma reação de clivagem da molécula, por ação do dióxido de enxofre¹², com formação de tiazol e pirimidina substituídos.

Com o objetivo de pesquisar o emprego desses aditivos em produtos cárneos, foram analisadas 167 amostras, a maioria de carne pré-moída, crua, e as demais, de carne crua em pedaços e hambúrgueres, coletadas predominantemente pelo Departamento Estadual de Polícia do Consumidor (DECON)¹⁶, em estabelecimentos comerciais varejistas da Região Metropolitana de São Paulo, no período de três anos. Até então, levantamento similar havia sido realizado, apenas em nível de frigoríficos, por BARRA², em São Paulo.

Os laudos analíticos emitidos pelo Instituto Adolfo Lutz, referentes à presença ou não daqueles conservadores nas carnes analisadas, auxiliaram na ação policial, principalmente do DECON, na comprovação de eventuais infrações contra a Saúde Pública.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 167 amostras, sendo 155 de carne pré-moída crua, 9 de carne crua em pedaços e 3 de hambúrgueres, no período de setembro de 1983 a agosto de 1986. As amostras foram colhidas pela Polícia Civil de São Paulo, preponderantemente pelo DECON, no comércio varejista da Grande São Paulo.

Nesta pesquisa, utilizou-se o método qualitativo descrito nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"¹⁷, ou seja, o da solução de cloreto de bário, que consiste no seguinte:

Reagentes

Solução de iodo (A)	{	Iodo	3,0 g
		Iodeto de potássio	3,0 g
		Água até completar ..	50,0 ml

Solução de cloreto de bário	{	Cloreto de bário	2,0 g
		Solução de iodo (A) ..	50,0 ml
		Água até completar ..	100,0 ml

Procedimento: Pese 50 g da amostra triturada. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 ml, adicione 10,0 ml de ácido clorídrico e 100,0 ml de água. Feche o frasco com rolha de borracha acoplada a uma das extremidades de um tubo em U. Mergulhe a outra extremidade do tubo dentro de um béquer de 100 ml, contendo 1,0 ml de solução de cloreto de bário e 40,0 ml de água. Aqueça o Erlenmeyer até ebulição e retire-o do fogo imediatamente. A turvação na solução do béquer indica presença de sulfito na amostra.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise das 167 amostras de carne estão demonstrados na tabela abaixo.

TABELA

Incidência de sulfito em amostras de carne bovina

Sulfito \ Amostras	Carne pré-moída crua	Carne crua em pedaços	Hambúrgueres	Total
	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)
presente	64 (41)	2 (22)	0 (0)	66 (40)
ausente	91 (59)	7 (78)	3 (100)	101 (60)
—	155	9	3	167

Das 155 amostras de carne crua, pré-moída, 64(41%) apresentaram pesquisa positiva para sais de sulfito (63 amostras foram coletadas pelo DECON e uma pelo Distrito Policial de Santo André). Quanto à carne crua em pedaços, 2(22%) das 9 unidades examinadas acusaram presença de sais de sulfito. Ambas as amostras haviam sido colhidas pelo DECON. Já as 3 amostras de hambúrgueres revelaram ausência desses aditivos.

Do total de 167 amostras analisadas verificou-se que 40% eram positivas para sais de sulfito.

DISCUSSÃO

O presente levantamento revela que uma considerável parcela dos estabelecimentos comerciais varejistas da Região Metropolitana de São Paulo vem desobedecendo à legislação vigente no que se refere ao uso fraudulento de sais de sulfito em produtos cárneos, principalmente na carne pré-moída crua. Deve-se ressaltar que a pré-moagem de carnes é também proibida por lei e passível de autuação¹⁸.

Por existir fiscalização atuante sobre os comerciantes varejistas na Região da Grande São Paulo, era de se esperar uma tendência cada vez menor na adição deste conservador em produtos cárneos. Mas o que ocorreu, na realidade, foi a cons-

tatação de um razoável número de infratores das normas legais vigentes.

Tendo em vista a inexistência de publicação de levantamento similar, no Brasil, fica prejudicada qualquer tentativa de comparação de resultados. Apenas, BARRA² efetuou trabalho com o mesmo objetivo, em nível de frigoríficos, onde nenhum caso foi constatado.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que, se a prática de pré-moagem de carnes vendidas a varejo fosse coibida pelos órgãos competentes, certamente a ocorrência do emprego de sais de sulfito neste produto seria minimizada ou até evitada.

Tendo em vista a elevada percentagem (44%) de amostras de carne que apresentaram provas positivas para sais de sulfito, colhidas na Capital e adjacências, onde existe fiscalização, presume-se que, em regiões onde esta não existe, ou é praticamente nula, a ocorrência deve ser maior. Portanto, faz-se necessária a ampliação efetiva do campo de ação dos órgãos de proteção ao consumidor, como o DECON, bem como o da Vigilância Sanitária, até os municípios fora da Região Metropolitana de São Paulo.

RIALA6/619

TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; TRUJILLO, L.M.; PENNACINO, M.R. & MARTINS, M.C.B. — Search for sulphite salts in meat products retailed in metropolitan São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):1-4, 1987.

ABSTRACT: A search for the illegal addition of sulphite salts was made in 167 samples of meat products on retail sale in Metropolitan São Paulo. The products included raw meat and hamburgers. The qualitative barium chloride method was employed. Results positive for sulphite (expressed in sulphur dioxide) were obtained in 66 samples (40% of total).

DESCRIPTORS: meat, beef (raw), analysis; sulphite salts in raw beef, detection; foods, frauds.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, A.J. & CANHOS, V.P. — *Aditivos em alimentos*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Coordenadoria da Indústria e Comércio. s.d. p. 141-3.
2. BARRA, A.J. — Ausência de sulfito de sódio na carne bovina colhida a nível de indústria. *Hig. alim.*, 2(1/2):64-6, 1983.
3. BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P.A. — *Introdução à química de alimentos*. Campinas, Fundação Cargil, 1985. p. 236-8.
4. BORGSTROM, G. — *Principles of food science*. v. 1: *Food technology*. New York, Macmillan, 1968. p. 299.
5. BORGSTROM, G. — *Principles of food science*. v. 2: *Food microbiology and biochemistry*. New York, Macmillan, 1968. p. 46-7.

6. BRASIL — Leis, decretos, etc. — Resolução nº 7/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 17 set. 1976. Seção I. pt. 1, p. 12299. Especifica na Tabela I anexa ao Decreto nº 55.871/65 os derivados de "dióxido de enxofre"...
7. CANHOS, D.A.L. & DIAS, E.L. — *Tecnologia de carne bovina e produtos derivados*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Coordenadoria da Indústria e Comércio. s.d. p. 78-9.
8. CARVALHO, J.C.A.P.; FRANCO, R.M. & OLIVEIRA, L.A.T. — Enterobacteriaceas em carne moída comercializada no Município de Magé, RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8º, Itabuna/Ilhéus, 1985, p. 45. *Programas e Resumos*.
9. DELAZARI, I. — Microbiologia de carnes: microorganismos causadores de deterioração da carne e produtos cárneos. *Bol. Soc. bras. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 49:8-14, 1979.
10. FLORES, J. — El dióxido de azufre: aspectos toxicológicos y problemática de su utilización en los productos carnicos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 21(4):471-4, 1981.
11. GAVA, A.J. — Emprego de conservadores em alimentos. *Bol. Soc. bras. Cienc. Tecnol. Alim.*, 18(3):190-1, 1984.
12. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICACIONES FOR FOODS — *Microbial ecology of foods*. v. 1: *Factors affecting life and death microorganisms*. New York, Academic Press, 1980. p. 180-4.
13. JAY, J.M. — *Modern food microbiology*. 2nd ed. New York, Van-Nostrand, c1978. p. 166-7.
14. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES — *Evaluation of the toxicity of a number of antimicrobials and antioxidants*. 6th Report. Geneva, WHO, 1962 (Tech. Rep. Ser., 228).
15. LOBANCO, C.M.; MARTINS, M.C.B.; PENNACINO, M.R.; TAVARES, M. & TRUJILLO, L.M. — Pesquisa de sais de sulfito em carnes comercializadas a varejo na Região Metropolitana de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 9º, Curitiba, 1986. *Programa Oficial, Regulamentos, Resumo dos trabalhos*.
16. PANETTA, J.C. — A polícia do consumidor. *Hig. alim.*, 2(1/2):11-12, 1983.
17. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, 1985. p. 268-9.
18. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. - Decreto nº 12.342 de 27 de setembro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 28 set. 1978. p.15, 1ª coluna. Aprova o Regulamento a que se refere o artigo 22 do Decreto-Lei 211, de 30 de março de 1970, que dispõe sobre normas de promoção, preservação e recuperação da saúde...
19. TAYLOR, S.L. & BUSH, R.K. — Sulfites as food ingredients. *Food Technol.*, 40(6):47-52, 1986.

Recebido para publicação em 16 de dezembro de 1986.

DETERMINAÇÃO DE NITRITOS E NITRATOS EM LINGÜIÇA E OUTRAS CONSERVAS DE CARNE COMERCIALIZADAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO*

Mário TAVARES**
Ana Maria ZANELATTO**
José Byron de CARVALHO**
Liliana Brancacio BACETTI**
Mickiko Y. TAKAHASHI**
Sabria AUED**

RIALA6/620

TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M.; CARVALHO, J.B.; BACETTI, L.B.; TAKAHASHI, M.Y. & AUED, S. — Determinação de nitritos e nitratos em lingüiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):5-10, 1987.

RESUMO: Para avaliar os níveis de nitritos e nitratos existentes em conservas de carne, face ao limite estabelecido pela legislação brasileira, foram analisadas 78 amostras, sendo 45 de lingüiça e as demais de carne temperada, salsicha, lombo de porco salgado ou defumado, mortadela, charque, pertences para feijoada, apresuntado e toucinho defumado. As amostras foram coletadas pelo Departamento Estadual de Polícia do Consumidor (DECON), na Região Metropolitana de São Paulo, no período de dois anos. Os resultados mostraram que 13 amostras (16,7%), 12 referentes a lingüiça e uma a apresuntado, excederam o limite legal de 200 p.p.m., quando calculada a soma de nitrito e nitrato, expressa em nitrito de sódio. Os laudos condenatórios, emitidos pelo Instituto Adolfo Lutz, auxiliaram a ação do DECON, como prova de crime contra a Saúde Pública.

DESCRITORES: conservas de carne, determinação de nitritos, nitratos; nitritos, nitratos, em conservas de carne.

INTRODUÇÃO

Os nitritos e nitratos de sódio ou potássio são substâncias largamente empregadas no processo de cura de produtos cárneos^{6,7,9,13}, sendo o nitrito o componente ativo e o nitrato uma fonte de obtenção do primeiro, por ação de bactérias redutoras e pH ácido^{6,7}. Para o beneficiamento dos caracteres organoléticos destes produtos, são necessários baixos níveis de nitrito, enquanto que, para produzir os efeitos antimicrobianos, são indispensáveis quantidades consideravelmente elevadas⁹, pois as alterações das conservas de carne são, em sua maioria, de natureza microbiana¹⁵.

O nitrito é de fundamental importância na coloração e sabor das carnes⁷. A cor vermelha, natural da carne, é devida à mioglobina muscular e aos traços de hemoglobina, que permaneceram no músculo após o abate. Ambos os pigmentos, por oxigenação, originam a oximioglobina e a oxihemoglobina, de colorações vermelho-brilhantes⁶. A fixação desta cor pelo nitrito se dá em pH ácido e em condições redutoras. O nitrito combina-se com a mioglobina da carne, formando a nitroso-mioglobina, composto róseo e estável que, pelo aquecimento, é convertido em nitroso-hemocromogênio, uma proteína desnaturada, que confere cor avermelhada aos produtos curados^{2,7,10}.

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 9º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 1986.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

O nitrito atua também como agente bacteriostático, inibindo o crescimento das células vegetativas e impedindo a germinação e crescimento dos esporos de *Clostridium sporogenes* e *Clostridium botulinum*^{6,9} e, conseqüentemente, a produção das neurotoxinas⁴. Sua ação é aumentada significativamente com o abaixamento do pH do meio⁷.

Embora o mecanismo da ação inibitória dos nitritos não esteja suficientemente esclarecido, sabe-se que o uso de salmoura, numa concentração de 4 a 6%, é um dos fatores que asseguram a preservação dos produtos cárneos¹³.

O botulismo, uma neuroparalisia causada pela ação de uma toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, tem na intoxicação alimentar a sua forma mais comum e mais grave⁵. É importante o controle, em nível industrial, da ocorrência desta bactéria, de modo a assegurar a destruição ou inibição do crescimento da mesma nos alimentos industrializados. No Brasil, sua ocorrência parece ser relativamente freqüente¹⁴.

Por outro lado, os riscos toxicológicos para a saúde humana, decorrentes do uso destes conservadores, particularmente em produtos cárneos, servem para justificar o crescente número de trabalhos publicados sobre as possibilidades de formação de nitrosamiñas, substâncias cancerígenas, a partir da ação dos nitratos e nitritos sobre aminas secundárias¹⁹.

As N-nitrosaminas são carcinogênicas para uma ampla faixa de espécies, causando câncer em diferentes partes do corpo. Algumas nitrosaminas podem levar ao câncer a curto prazo, enquanto outras são altamente mutagênicas^{17,20,22}.

Alguns autores ressaltam, ainda, a possível ocorrência de meta-hemoglobinemia, principalmente em crianças^{8,20}. Os nitritos, em baixa acidez, típica do estômago das crianças, combinam-se com a hemoglobina do sangue, impedindo a mesma de efetuar o transporte normal de oxigênio²⁰.

Com o objetivo de controlar o nível destes aditivos nas conservas de carne, a legislação brasileira limitou em 200 p.p.m, expressos em nitrito de sódio, o teor residual máximo de um e/ou outro aditivo no produto a ser consumido, com exceção do charque³.

Para avaliar tais níveis em produtos cárneos, foram analisadas 78 amostras, 45 das quais de lingüiça, coletadas pelo Departamento Estadual de

Polícia do Consumidor (DECON) em estabelecimentos comerciais varejistas da Grande São Paulo, no período de dois anos. O DECON, criado em 1983, tem como uma de suas atribuições básicas a execução da polícia judiciária relativa às infrações penais contra a Saúde Pública¹⁶.

Os laudos analíticos, expedidos pelo Instituto Adolfo Lutz, relativos a conservas de carne com valores de nitrato e nitrito acima do permitido, auxiliaram na ação do órgão policial na comprovação do crime previsto naquela atribuição básica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 78 amostras, sendo 38 de lingüiça, 7 de massa para o preparo de lingüiça, 8 de carne temperada, 7 de salsicha, 6 de lombo de porco (4 de lombo salgado e dois de lombo defumado), 5 de mortadela, 3 de charque, 2 de pertences para feijoada, 1 de apresetado e 1 de toucinho defumado, no período de outubro de 1984 a julho de 1986. As amostras foram coletadas pelo DECON, na Região Metropolitana de São Paulo.

Devido ao alto teor de proteína dos produtos cárneos, foi necessário, inicialmente, submeter as amostras a uma desproteínização, sem destruição do nitrito, conforme o método descrito por LARA *et alii*¹² em "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"¹⁸. A seguir, realizou-se uma prévia análise da amostra. Confirmada a presença de um ou outro aditivo, ou de ambos, procedeu-se à determinação quantitativa dos nitritos e nitratos, segundo os métodos descritos nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"¹⁸.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise das 78 amostras de conservas de carne estão relacionados na tabela da página seguinte, na ordem decrescente do número coletado, por classe. De acordo com esses resultados, pode-se observar que em 13 amostras (16,7%) analisadas, sendo 10 referentes a lingüiça, 2 a massa para o preparo de lingüiça e uma única a apresetado, o teor de nitrito e nitrato, expresso em nitrito de sódio, ultrapassou o limite estabelecido de 200 p.p.m.

Todos os produtos cárneos foram comercializados a granel. Verificou-se que em 6 casos as amostras procediam de um mesmo estabelecimento clandestino¹.

TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M.; CARVALHO, J.B.; BACETTI, L.B.; TAKAHASHI, M.Y. & AUED, S.
 — Determinação de nitritos e nitratos em linguiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47:(1/2):5-10, 1987.

TABELA

Níveis de nitratos e nitritos em conservas de carne

(Continua)

Amostra n ^o	Tipo de amostra	NaNO ₂ p.p.m.	NaNO ₃ p.p.m.	NaNO ₂ + NaNO ₃ expressos em NaNO ₂ p.p.m.
1	linguiça	6,9	—	6,9
2	linguiça	4,9	—	4,9
3	linguiça	187,0	—	187,0
4	linguiça	18,2	261,1	230,0
5	linguiça	2,0	2,0	3,6
6	linguiça	34,3	332,9	304,4
7	linguiça	—	202,5	164,2
8	linguiça	18,3	3,9	21,4
9	linguiça	264,0	74,8	324,6
10	linguiça	189,5	506,9	600,7
11	linguiça	—	—	—
12	linguiça	—	—	—
13	linguiça	—	—	—
14	linguiça	2,5	4,2	5,9
15	linguiça	—	5,6	4,5
16	linguiça	—	7,8	6,3
17	linguiça	2,6	4,5	6,3
18	linguiça	2,5	35,3	31,1
19	linguiça	2,4	35,0	30,7
20	linguiça	2,7	9,1	10,0
21	linguiça	2,7	10,8	11,4
22	linguiça	217,0	518,0	637,1
23	linguiça	201,0	286,0	432,9
24	linguiça	321,0	377,0	626,7
25	linguiça	332,0	313,0	585,8
26	linguiça	6,4	150,8	128,7
27	linguiça	6,4	141,4	121,1
28	linguiça	5,6	8,3	12,4
29	linguiça	9,6	16,7	23,2
30	linguiça	31,0	260,0	241,8
31	linguiça	—	—	—
32	linguiça	—	—	—
33	linguiça	4,8	7,1	10,5
34	linguiça	66,3	7,5	72,4
35	linguiça	3,3	41,1	36,7
36	linguiça	9,7	5,4	13,2
37	linguiça	8,9	6,7	13,9
38	linguiça	23,0	257,0	231,4
39	massa p/ o preparo de linguiça	22,7	—	22,7
40	massa p/ o preparo de linguiça	8,7	—	8,7
41	massa p/ o preparo de linguiça	—	—	—
42	massa p/ o preparo de linguiça	—	—	—
43	massa p/ o preparo de linguiça	—	—	—
44	massa p/ o preparo de linguiça	522,0	752,0	1131,8
45	massa p/ o preparo de linguiça	897,0	671,0	1441,1
46	carne temperada	—	—	—
47	carne temperada	—	—	—
48	carne temperada	14,7	147,7	134,4

(Conclusão)

Amostra nº	Tipo de amostra	NaNO ₂ p.p.m.	NaNO ₃ p.p.m.	NaNO ₂ + NaNO ₃ expressos em NaNO ₂ p.p.m.
49	carne temperada	0,9	11,1	9,9
50	carne temperada	1,3	3,7	4,3
51	carne temperada	—	—	—
52	carne temperada	—	—	—
53	carne temperada	7,4	119,9	104,6
54	salsicha	43,6	—	43,6
55	salsicha	2,9	2,9	5,3
56	salsicha	3,5	—	—
57	salsicha	1,9	5,7	6,5
58	salsicha	2,0	5,2	6,2
59	salsicha	15,5	—	15,5
60	salsicha	12,9	—	12,9
61	lombo de porco salgado	2,0	115,7	95,8
62	lombo de porco salgado	1,8	125,9	103,9
63	lombo de porco salgado	71,6	24,5	82,5
64	lombo de porco salgado	56,3	32,0	77,6
65	lombo de porco defumado	1,2	1,3	2,2
66	lombo de porco defumado	1,7	3,5	4,8
67	mortadela	22,0	190,8	176,8
68	mortadela	4,0	—	4,0
69	mortadela	7,6	—	7,6
70	mortadela	8,5	—	8,5
71	mortadela	9,8	—	9,8
72	charque	—	—	—
73	charque	—	—	—
74	charque	—	—	—
75	pertences para feijoada	97,7	8,5	104,6
76	pertences para feijoada	6,2	89,1	78,5
77	apresentado	465,9	46,1	503,4
78	bacon	—	235,8	191,2

(—) = Não houve desenvolvimento de cor.

DISCUSSÃO

Comparando-se os resultados do presente trabalho com os levantamentos efetuados por KOMATSU *et alii*¹¹ e por SOUZA *et alii*²¹, observamos o seguinte: os primeiros, analisando 510 e 558 amostras de embutidos diversos, quanto aos teores de nitratos e nitritos, respectivamente, verificaram que nenhuma delas apresentou valor de nitrato acima do permitido pela legislação, enquanto que cerca de 13% das 185 salsichas incluídas nas análises apresentaram teores de nitrito acima do estabelecido legalmente; todas as amostras analisadas foram coletadas em supermercados e frigoríficos da cidade de São Paulo. Por sua vez, SOUZA *et alii*, examinando 50 amostras também de embutidos diversos, comercializados na cidade de Jaboticabal, encontraram, em 60% das salsi-

chas, 50% das linguiças, 30% das mortadelas, 20% dos presuntos e 10% dos salames, níveis de nitrito de sódio superiores a 200 p.p.m.. Convém ressaltar que os métodos usados nos trabalhos daqueles autores foram diferentes do utilizado em nosso trabalho.

CONCLUSÃO

Este levantamento indica que uma pequena parcela dos estabelecimentos comerciais varejistas da Região Metropolitana de São Paulo não está atendendo às normas legais vigentes quanto ao limite de uso de nitrito e nitrato em conservas de carne, a exemplo do que ocorrera no levantamento efetuado por KOMATSU *et alii*, apesar do controle dos órgãos de fiscalização. No levantamento

realizado por SOUZA *et alii*, houve uma incidência bem maior de níveis acima do tolerado legalmente; essa maior incidência pode ser atribuída à ausência de fiscalização por órgãos governamentais, na cidade de Jaboticabal, enquanto que, na Região da Grande São Paulo, além da Inspeção Federal, existe o Departamento Estadual de Polícia do Consumidor (DECON) criado em 1983, subordinado à Polícia Civil de São Paulo, que vem desempenhando um trabalho eficiente nesta fiscalização. Seria importante que, para o benefício da saúde do consumidor, não só a Capital e adjacências, como os demais Municípios pudessem contar

com aqueles órgãos. No caso do DECON, pelo decreto que o criou, é facultado o exercício de suas atribuições nos demais municípios, por determinação superior. Certamente, tal providência viria minimizar os riscos aos quais a saúde da população está exposta.

É necessário que os responsáveis pelo processamento industrial de conservas de carne se conscientizem da importância da adoção de medidas que possibilitem a obtenção de produtos finais de boa qualidade, que atendam às normas legais vigentes para estes produtos.

RIALA6/620

TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M.; CARVALHO, J.B.; BACETTI, L.B.; TAKAHASHI, M.Y. & AUED, S. — Determination of nitrites and nitrates in sausage and other preserved meats retailed in Metropolitan São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):5-10, 1987.

ABSTRACT: A total of 78 samples of meat products retailed in Metropolitan São Paulo were collected for Public Health control in a period of two years. The sampled foods included 45 samples of sausage and the remainder consisted of hot dogs, salted or smoked pork loin, bologna, seasoned beef, dried beef, ham and bacon. Excess content of nitrites and nitrates (expressed as sodium nitrite) was found in 13 (16,7%) samples of sausage and in one of ham.

DESCRIPTORS: meat, preserved, nitrite and nitrate determination; nitrite, nitrate in preserved meat, determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUED, S.; BACETTI, L.B.; CARVALHO, J.B.; TAKAHASHI, M.Y.; TAVARES, M. & ZANELATTO, A.M. — Determinação de nitritos e nitratos em lingüiça e outras conservas de carne comercializadas na Região Metropolitana de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 9º, Curitiba, 1986. *Programa Oficial, Regulamentos, Resumos dos trabalhos*.
2. BORGSTROM, G. — *Principles of food science. v. 2: Food microbiology and biochemistry*. New York, Macmillan, 1968. p. 46-7.
3. BRASIL. Leis, decretos etc. — Resolução normativa nº 08/79 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1º jun. 1979. Seç. I, pt. 1, p. 7843. Fixa na Tabela I, anexa ao Decreto nº 55.871 de 1965, para os Nitratos e Nitritos, a relação de alimentos e bebidas nos quais podem ser empregados... e revoga a Resolução nº 9-76 da CNNPA...
4. DELAZARI, I. — Inocuidade e perecibilidade de produtos cárneos curados. *Bol. Soc. bras. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 16(1):56-66, 1982.
5. DELAZARI, I. & D'AVILLA, Z.S. — Botulismo: ocorrência, diagnóstico e medidas terapêuticas. *Hig. aliment.*, São Paulo, 2(3):132-49, 1983.
6. FIGUEIREDO, I.B. — Nitrito e compostos nitrogenados em alimentos. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 18(4):469-83, 1981.
7. GAVA, A.J. — Emprego de conservadores em alimentos. *Bol. Soc. bras. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 18(3):191-2, 1984.
8. HOETHER, R.C. — Methaenoglobinaemia. *Lancet*, 1:1324-5, 1951.
9. JAY, J.M. — *Modern food microbiology*. 2nd ed. New York, Van Nostrand [1978] p. 176-81.
10. JENSEN, L.B. & URBAIN, W.M. — The heme pigments of cured meats. I. Preparation of nitric oxide hemoglobin and stability of the compound. *Food Res.*, 5:593-606, 1940.
11. KOMATSU, I.; TAKINO, M. & GALLI, F. — O teor de nitritos e nitratos nos produtos cárneos fabricados no Estado de São Paulo. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 29 (7, supl.): 124, 1977. [Resumo 53-A.5.1]
12. LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. & SILVEIRA, N. — Determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(2):161-8, 1978.
13. LEITÃO, M.F.F. — Controle do desenvolvimento microbiano no processamento industrial da carne e produtos cárneos. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 21(1):35-6, 1984.

TAVARES, M.; ZANELATTO, A.M.; CARVALHO, J.B.; BACETTI, L.B.; TAKAHASHI, M.Y. & AUED, S.
— Determinação de nitritos e nitratos em lingüiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47:(1/2):5-10, 1987.

14. LEITÃO, M.F.F. — *Clostridium botulinum* no Brasil e seu controle a nível industrial. *Hig. Aliment.*, São Paulo, 3(1):34-6, 1984.
15. MUCCIOLA, P. — *Carnes: conservas e semi-conservas, tecnologia e inspeção sanitária*. São Paulo, Icone, 1985. p. 88-113. (Coleção Brasil Agrícola).
16. PANETTA, J.C. — A policia do consumidor. *Hig. Aliment.*, São Paulo, 2(1/2):11-12, 1983.
17. REYS, F.G.R. & SCANLAN, R.A. — N-nitrosaminas: formação e ocorrência em alimentos. *Bol. Soc. bras. Cienc. Technol. Aliment.*, 18(4):299-309, 1984.
18. SÃO PAULO, Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985. p. 94-102.
19. SEBRANEK, J.G. & CASSENS, R.G. — Nitrosamines: a review. *J. Milk Food Technol.*, 36(2):76-91, 1973.
20. SEN, N.P. — Nitrosamines. In: LIENER, I.E., ed. — *Toxic constituents of animal foodstuffs*. New York, Academic Press, 1974. p. 131-94. (Food Science and Technology, a series of monographs).
21. SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FALEIROS, R.R.S. & CARVALHO, M.R.B. — Determinação de nitrito e nitrato de sódio em produtos embutidos de carne, comercializados na cidade de Jaboticabal, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8º, Itabuna/Ilhéus, 1985. p. 2. *Programas e Resumos*.
22. WHO TASK GROUP ON ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA FOR NITRATES, NITRITES AND N-NITROSO COMPOUNDS. Lyon, 1976. *Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds*. Geneva, WHO, 1978. p. 18. (Environmental Health Criteria 5).

Recebido para publicação em 16 de dezembro de 1986.

OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES PULMONARES DEVIDAS AO *MYCOBACTERIUM KANSASII*, EM SÃO PAULO, BRASIL*

Eny Aparecida Matheus da SILVA**
José Benício Nunes de MIRANDA**
Lucilaine FERRAZOLI**
Marcia Evangelina ALGE**
Regina Ruivo Ferro e SILVA**
Terumi O. FUZIHARA**
Moisés PALACI**

RIALA6/621

SILVA, E.A.M.; MIRANDA, J.B.N.; FERRAZOLI, L.; ALCE, M.E.; SILVA, R.R.F.; FUZIHARA, T.O. & PALACI, M. — Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):11-17, 1987.

RESUMO: No período de 1984 a 1985, foram identificados, através de cultura de escarro e testes laboratoriais especializados, na Região dos municípios de Santo André, São Bernardo, São Caetano e Diadema (ABCD), em São Paulo, nove casos de infecção pulmonar, causada pelo *Mycobacterium kansasii*. Pelo fato de algumas micobactérias causarem quadros pulmonares semelhantes ao da tuberculose e por ser o diagnóstico destas infecções, sob o ponto de vista clínico, radiológico e histológico, insuficiente para diferenciar as doenças pulmonares causadas pelos bacilos álcool-ácido resistentes, recomenda-se a realização de exames bacteriológicos completos, em diferentes áreas do Estado, em pacientes com suspeita de tuberculose, em pacientes positivos ao exame bacterioscópico e naqueles com resposta desfavorável ao tratamento específico para tuberculose.

DESCRITORES: infecção pulmonar por *Mycobacterium kansasii*, ocorrência em São Paulo, Brasil; infecção por micobactéria.

INTRODUÇÃO

A confirmação laboratorial do diagnóstico clínico da tuberculose-doença é uma das atividades consideradas de rotina nos laboratórios de Saúde Pública. O exame informa quais os doentes que têm alta capacidade infectante, sendo por isso os maiores responsáveis pela disseminação da moléstia. Na maioria dos casos, um simples exame bacterioscópico que será repetido a intervalos certos, durante o tratamento, atende às necessidades da clínica. No entanto, em certos casos com sintomatologia clínica idêntica à da tuberculose e com presença de bacilos semelhantes ao *Mycobacterium tuberculosis* nos exames bacterioscópicos das se-

creções pulmonares, podemos estar frente a outras infecções por micobactérias pertencentes ao grupo das chamadas micobactérias não tuberculosas que somente poderiam ser identificadas através de técnicas laboratoriais complexas. Certas características ambientais parecem favorecer a disseminação destas bactérias⁶ e, não raro, número apreciável de casos pode ser identificado em determinados locais³.

No Brasil há raros trabalhos sobre a frequência da infecção pelas micobactérias "atípicas", com dados obtidos de reações intradérmicas (hipersensibilidade) e do cultivo destas micobactérias^{1,8,9,11,14}. micobactérias^{1,8,9,11,14}.

* Realizado no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP e na Seção de Bacteriologia do Laboratório I do Instituto Adolfo Lutz, Santo André, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Pelo fato de serem escassos os dados da literatura nacional especializada, referentes às pesquisas em regiões delimitadas das micobactérias não-tuberculosas e, também, pela inexistência de identificação laboratorial final destas bactérias, resolvemos eleger, na região da Grande São Paulo, os municípios do ABCD para iniciar esta investigação. Se forem demonstrados resultados relevantes, haverá necessidade de alertar as autoridades sanitárias constituídas para que tomem medidas cabíveis.

Neste trabalho, apresentamos os resultados iniciais desta investigação, assim como, para maior divulgação técnica, a identificação laboratorial das amostras de micobactérias não-tuberculosas isoladas, acompanhada de alguns dados clínicos disponíveis dos pacientes, correspondentes a estes achados.

MATERIAL E MÉTODOS

A rede de laboratórios do Instituto Adolfo Lutz é responsável pela confirmação diagnóstica laboratorial dos casos suspeitos de tuberculose e pelo acompanhamento da evolução clínica, através de exames bacterioscópicos seriados. As culturas para bacilos álcool-ácido resistentes vêm sendo realizadas por alguns laboratórios regionais, enquanto que a identificação destas culturas, assim como a verificação da sensibilidade às diferentes drogas tuberculoestáticas, são atividades do Laboratório Central.

No período de 1984 a 1985, os Laboratórios I e II do Instituto Adolfo Lutz, respectivamente em Santo André e São Caetano do Sul, receberam 6.976 amostras de exsudatos pulmonares para o diagnóstico da tuberculose. A metodologia utilizada pelo Instituto para este diagnóstico foi a recomendada no "Manual de Bacteriologia da Tuberculose"¹⁰, a saber: o exame bacterioscópico é feito pela técnica de coloração de Ziehl-Nielsen e, para a cultura dos bacilos álcool-ácido resistentes, o material, após tratamento pelo método de Petroff, é cultivado no meio de Lowenstein-Jensen¹⁰.

Alguns critérios de ordem geral foram adotados, a evolução clínica ou o aspecto das colônias nas culturas foram condições para que prosseguissemos na identificação da micobactéria isolada e verificação de sua sensibilidade aos quimioterápicos.

Para identificação das bactérias nas culturas foram levados em consideração o tempo de crescimento, o aspecto e a pigmentação das colônias^{7,17} e as seguintes provas bioquímicas e enzimáticas: produção de niacina⁴, atividade catalásica⁵ à tem-

peratura ambiente e a 68°C, prova de pirazinamidase¹⁶, redução do nitrato¹⁵, prova da urease¹⁶, e hidrólise do Tween¹⁸.

As provas de niacina, catalase, pirazinamidase e a pigmentação das colônias diferenciaram o *Mycobacterium tuberculosis* do grupo das micobactérias não-tuberculosas de crescimento lento, com pigmentação fotoinduzida, ao qual pertence o *Mycobacterium kansasii*. Para a diferenciação do *M. kansasii* das outras micobactérias dentro do seu grupo, foram utilizadas as provas do Tween, urease, pirazinamidase e redução do nitrato.

Em levantamento realizado nos prontuários dos pacientes estudados obtivemos dados clínicos similares aos verificados em pacientes com tuberculose pulmonar. A apresentação destes dados está na tabela 1 da página seguinte.

RESULTADOS

Das 6.976 amostras examinadas, 866 foram positivas para bacilos álcool-ácido resistentes. Destas, 736 foram positivas pelo exame bacterioscópico e 130 o foram somente na cultura. Entre as culturas em que houve desenvolvimento de colônias, 9 apresentaram características atípicas de crescimento em relação ao crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*, ou pertenciam a doentes que tiveram evolução clínica desfavorável na vigência do tratamento, razões pelas quais estas 9 culturas tiveram prosseguimento bacteriológico para identificação da espécie de micobactéria isolada. A tabela 2 (p. 14) apresenta o comportamento das culturas.

Como pode ser observado na tabela 2, todas as amostras atípicas testadas apresentavam comportamento diferente do apresentado pelo *M. tuberculosis*, e semelhante ao do grupo de micobactérias fotocromógenas. Obviamente a cepa-padrão do *M. kansasii* foi escolhida para comparação pelo fato de ser esta amostra representativa do grupo, e por ter sido descrita freqüentemente como causadora de alterações pulmonares no ser humano.

A identificação das culturas isoladas frente às provas do Tween, urease, pirazinamidase e redução do nitrato permitiram, segundo seu comportamento, caracterizá-las como *M. kansasii* pois que, diferentemente de *M. marinum*, *M. simiae* e *M. asiaticum*, as culturas foram positivas nas provas de hidrólise do Tween, urease e redução do nitrato, e negativas na prova de pirazinamidase. Estas amostras foram submetidas aos testes de sensibilidade quimioterápicos utilizados no tratamento

SILVA, E.A.M.; MIRANDA, J.B.N.; FERRAZOLI, L.; ALGE, M.E.; SILVA, R.R.F.; FUZIHARA, T.O. & PALACI, M. — Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):11-17, 1987.

TABELA 1

Dados clínicos disponíveis dos nove pacientes com infecção pulmonar causada pelo M. Kansasii

Caso nº	Idade/sexo	Procedência	Dados clínicos	Exame ao RX	Data do diagnóstico	
					Tuberculose	M. Kansasii
1	38/M	C.S. Utinga	Perda de peso, febre, tosse	Infiltração no ápice esq., processo específico bilateral	abr./1977	mar./1985
2	22/M	C.S. Utinga	febre, cansaço, tosse	processo específico bilateral	jul./1983	nov./1985
3	27/M	C.S. Santo André	tosse, febre	NR	nov./1983	jun./1985
4	31/M	C.S. Diadema	tosse, cansaço	NR	abr./1984	abr./1984
5	34/M	C.S. Utinga	pneumonia, perda de peso	travas densas e infiltração no campo sup. direito	jul./1984	jul./1984
6	36/M	C.S. Ribeirão Pires	tosse, cansaço, febre, perda de peso	estrias no ápice esq.	set./1985	set./1985
7	63/M	C.S. São Bernardo	tosse e perda de peso	imagem nodular em 1/3 sup. dir.	out./1985	out./1985
8	21/M	C.S. Diadema	NO	NR	maio/1985	maio/1985
9	60/M	C.S. São Caetano do Sul	dores nas costas, escarro hemoptóico	travas densas, nódulos no ápice esq., ausência de derrame	jul./1985	jul./1985

M = masculino.

NR = não realizado.

NO = dados não obtidos.

TABELA 2

Comportamento bioquímico das micobactérias isoladas

Amostras	Pigmentação foto-induzida	Niacina	Catalase		Pirazinamidase
			TA	68°C	
T-288	+	-	+	+	-
T-397	+	-	+	+	-
T-536	+	-	+	+	-
T-287	+	-	+	+	-
T-594	+	-	+	+	-
T-657	+	-	+	+	-
T-671	+	-	+	+	-
T-278	+	-	+	+	-
T-667	+	-	+	+	-
Controles (cepas-padrão)					
<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	+
<i>M. kansasii</i>	+	-	+	+	-

TA = temperatura ambiente.

(+) = amostra positiva.

(-) = amostra negativa.

da tuberculose, e apresentaram resultados variáveis para Estreptomicina e Pirazinamida e, por serem semelhantes à cepa-padrão do *M. kansasii*, foram caracteristicamente resistentes à Isoniazida e sensíveis ao Etambutol e Rifampicina. Foi exceção a amostra T-288 que se mostrou resistente a todos os quimioterápicos testados. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 3 (p. 15).

DISCUSSÃO

Nossos achados iniciais confirmaram, segundo consta na literatura especializada, que entre as micobactérias não tuberculosas o *Mycobacterium kansasii* é a espécie mais freqüente em doenças pulmonares humanas, ocorrendo predominantemente em indivíduos do sexo masculino. A incidência da doença atinge indivíduos sem quaisquer problemas pulmonares anteriores, moradores em áreas industrializadas de zonas urbanas, geograficamente bem delimitadas⁶.

A doença é clínica e radiologicamente semelhante à tuberculose, podendo regredir espontaneamente ou através de tratamento² ou, ainda, desenvolver-se até a destruição do tecido pulmonar¹². A disseminação é rara¹³.

Os problemas causados por micobactérias não tuberculosas aumentaram nos últimos anos em

países que conseguiram controlar a tuberculose. Entretanto, em determinadas regiões, como a Checoslováquia, a infecção pelo *M. kansasii* é endêmica em algumas áreas, ao mesmo tempo em que a incidência da tuberculose é relativamente alta. Dados deste país informam que a incidência do *M. kansasii* subiu cerca de 33% em relação aos casos de *M. tuberculosis*. Nos Estados Unidos, os últimos levantamentos demonstraram que 65% dos casos de infecção pulmonar foram devidos ao *M. tuberculosis*, enquanto que 3% ao *M. kansasii*³.

No Brasil, não existem informações da magnitude deste problema, talvez devido à preocupação existente em relação à tuberculose ou ao fato de as micobactérias não-tuberculosas apresentarem virulência variável por vezes até discutida, dificultando sua associação com a doença, problema acrescido, sob o ponto de vista do diagnóstico, pela falta de condições, no país, de laboratórios aptos a realizar exames bacteriológicos completos, necessários à identificação das micobactérias.

Diante dos resultados iniciais obtidos nos municípios da Região do ABCD acreditamos que, paralelamente aos esforços para o diagnóstico da tuberculose, seria recomendável a complementação bacteriológica, através de cultura e conseqüente identificação de todos os casos suspeitos de tuberculose. Tal procedimento, que faz parte de um

TABELA 3

Comportamento das amostras de *M. Kansaii* isoladas, frente às drogas usadas no tratamento da tuberculose

Drogas	Amostras analisadas										Cepa-padrão	
	T-288	T-397	T-536	T-287	T-594	T-657	T-671	T-278	T-667	<i>M. tuber- culosis</i>	<i>M. Kansaii</i>	
Isoniazida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	
Rifampicina	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Etambutol	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Estreptomicona	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	
Pirazinamida	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	

R = resistente.

S = sensível.

SILVA, E.A.M.; MIRANDA, J.B.N.; FERRAZOLI, L.; ALGE, M.E.; SILVA, R.R.F.; FUZIHARA, T.O. & PALACI, M. — Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Bra-
sil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 47(1/2):11-17, 1987.

projeto global a longo prazo, traria informações sobre as micobactérias, possibilitando o conhecimento do seu comportamento, principalmente daquelas, como o *Mycobacterium kansasii*, que causam alterações pulmonares semelhantes às da tuberculose, acarretando problemas sociais, econômicos, humanos e de natureza clínico-epidemiológica. Obviamente, estes achados iniciais serviram para indicar que se deve continuar a investigação

com parâmetros fixos e a longo prazo. Este projeto está em desenvolvimento.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos aos Dr. Gil Vital Álvarores Pessoa pelo incentivo. Ao Dr. Luis Florêncio de Salles Gomes, pelas sugestões e colaboração na apresentação deste trabalho.

RIALA6/621

SILVA, E.A.M.; MIRANDA, J.B.N.; FERRAZOLI, L.; ALGE, M.E.; SILVA, R.R.F.; FUZIHARA, T.O. & PALACI, M. — Pulmonary disease due to *Mycobacterium kansasii* in São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):11-17, 1987.

ABSTRACT: The occurrence of 9 cases of human pulmonary infection due to *Mycobacterium kansasii* was disclosed in the ABCD region of Metropolitan São Paulo during the period 1984-1985. The patients showed clinical manifestations of chronic respiratory illness. The mycobacteria were isolated, identified and tested for drug sensitivity. These observations showed the limitations of the knowledge on mycobacteria other than *M. tuberculosis*. Because clinical, radiologic and histologic studies are as yet insufficient for the differentiation of pulmonary diseases due to various types of acid-fast organisms, bacteriological identification of each strain is required.

DESCRIPTORS: lung disease due to *Mycobacterium kansasii*, occurrence in São Paulo, Brazil; *Mycobacterium kansasii*; mycobacterium infections.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARANTES, G.R. & TRIVELLATO, L.B. — Contaminação do escarro de sintomáticos respiratórios por micobactérias "atípicas" e suas implicações na busca de casos de tuberculose pulmonar (nota prévia). *Rev. Med. Hosp. Clin. Fac. Med. Rib. Preto*, 19(2):63-7, 1986.
2. FRANCIS, P.B.; JAY, S.J.; JOHANSON, W.G., JR — The course of untreated *Mycobacterium kansasii* disease. *Am. Rev. respir. Dis.*, 111:477-87, 1975.
3. GOOD, R.C. & SNIDER, D.E., JR — Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. *J. infect. Dis.*, 146:829-833, 1982.
4. KILBURG, J.C. & KUBICA, G.P. — Reagent-impregnated paper strips for detection of niacin. *Am. J. clin. Pathol.*, 50:530-2, 1968.
5. KUBICA, C.P. & WAYNE, L.C. — Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. An attempt to Subgroup of these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH. *Am. Rev. respir. Dis.*, 81:387-91, 1960.
6. KUBIN, M.; SVADOVÁ, E.; MEDEK, M.; CHOBOT, S. & OLSOVSKY, Z. — *Mycobacterium kansasii* infection in an endemic area of Czechoslovakia. *Tubercle*, 61:207-12, 1980.
7. LICHTENSTEIN, M.R.; TAKIMURA, Y. & THOMPSON, J.R. — Photochromogenic mycobacterial pulmonary infection in a group of hospitalized patients in Chicago. *Am. J. Med.*, 4:471, 1964.
8. MAGALHÃES, M. — Freqüência das micobactérias atípicas no Recife. *Rev. Serv. nac. Tuberc.*, 10:217-23, 1966.
9. MAGARÃO, M.F. & LORIAN, V. — Des mycobactéries anormales dans notre pratique pneumologique. *Acta tuberc. pneumol. scand.*, 51:252, 1962.
10. MANUAL de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, Div. Nac. Pneumol. Sanitária, 1980. 82 p.
11. MENDONÇA, C.P.; FALCÃO, D.P.; SCHIMIZU, M.T.; SELIN, M.J.; BEAM, R.E. & SUD, M. — Hipersensibilidade a micobactérias em populações de Araraquara, São Paulo. *Rev. Div. nac. Pneumol. sanit.*, 22:7-16, 1978.
12. MEYER, L. & DAVID, H. — *Mycobacteriologie en Santé Publique*. Paris, Centre National de Reference pour la Tuberculose e les Mycobactéries, Inst. Pasteur, 1980.

SILVA, E.A.M.; MIRANDA, J.B.N.; FERRAZOLI, L.; ALGE, M.E.; SILVA, R.R.F.; FUZIHARA, T.O. & PALACI, M. — Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):11-17, 1987.

13. PENNY, M.E. & COLE, B.G. — Two cases of *Mycobacterium kansasii* infection occurring in the same household. *Tubercle*, 63:129-31, 1982.
14. SILVEIRA, J.; DARZINS, E. & MATOS, A.V. — *Mycobacteria* apatógenas isoladas no escarro lavado gástrico e lavado brônquico. *Arq. Inst. bras. Invest. Tuberc.*, 10:143-54, 1951.
15. VIRTANE, S. — A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta tuberc. scand.* (suppl.), 48:1-119, 1960.
16. WAYNE, L.G. — Simple pyrazinamidase urease test for routine identification of mycobacteria. *Am. Rev. resp. Dis.*, 109:147-51, 1974.
17. WAYNE, L.G. & DOUBEK, J.R. — The role of the air in the photochromogenic behaviour of *Mycobacterium kansasii*. *Am. J. clin. Pathol.*, 42:431-5, 1964.
18. WAYNE, L.G., DOUBEK, J.R. & RUSSEL, R.L. — Test employing Tween 80 as substrate. *Am. Rev. resp. Dis.*, 90:588-97, 1965.

Recebido para publicação em 8 de janeiro de 1987.

NÍVEIS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM SORO SANGÜÍNEO DE PESSOAS EXPOSTAS À DOENÇA DE CHAGAS NO BRASIL*

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

RIALA6/622

LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K.— Níveis de pesticidas organoclorados em soro sangüíneo de pessoas expostas à doença de Chagas no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):19-24, 1987.

RESUMO: Níveis de pesticidas organoclorados foram determinados em 51 amostras de sangue de moradores numa área onde a doença de Chagas é controlada pela pulverização das casas com hexaclorocicloexano (HCH) para eliminar insetos vetores (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida*, *Triatoma infestans*). Foram coletadas 28 amostras de sangue de pessoas cujas casas foram tratadas com HCH (grupo 1) e 23 de moradores em casas não tratadas (grupo 2). Os resultados encontrados mostraram diferença significativa entre os dois grupos. No grupo 1, os níveis de HCH variaram de 1 a 35 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (ppb), com mediana de 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (ppb) e, no grupo 2, variaram de < 1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ a 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$, com mediana de 1 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Foram detectados pp'DDE em 100% das amostras e Dieldrin em 43,1% das mesmas.

DESCRITORES: resíduos de pesticidas organoclorados, detecção em soro sangüíneo humano; pesticidas, resíduos; cromatografia em fase gasosa.

INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas de Saúde Pública em nosso país é a doença de Chagas, devido à sua vasta distribuição e altos índices de prevalência de evolução. Esta doença, genuinamente americana, foi descrita em países como Estados Unidos, México, Guatemala, Nicarágua, Costa Rica, El Salvador, Panamá e em todos os países da América do Sul, com exceção das Guianas, Inglesa e Holandesa⁶.

A incidência da epidemia está relacionada ao baixo nível econômico e social da região, à existência de vetores domiciliados em tipos precários de habitação do homem rural, que apresentam condições favoráveis para sua proliferação como rancho de pau-a-pique, mocambos cobertos de sapê, residências de madeira com tábuas mal ajustadas e sujas, e às escassas condições higiênicas de seus habitantes.

O extermínio desta doença baseia-se no combate direto aos insetos transmissores (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma sordida*) com pesticida de efeito residual prolongado, como hexaclorocicloexano (HCH), que é aplicado nas casas e suas adjacências, geralmente duas vezes ao ano.

Poucos são os levantamentos feitos em nosso país mostrando a contaminação dos aplicadores de pesticidas; entretanto, apesar de pouca divulgação, estes são treinados para proteger-se dos pesticidas, enquanto que os moradores de casas a serem tratadas nem sempre são devidamente instruídos quanto ao risco a que estão sujeitos.

Para se conhecer a realidade deste importante problema de Saúde Pública foram analisados soros sangüíneos de moradores de casas tratadas e não tratadas com HCH, na região de Aloândia, Estado de Goiás, logo após uma aplicação feita

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado em "The Sixth International Congress of Pesticides Chemistry", Ottawa, 1986.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) do Ministério da Saúde.

A determinação do HCH foi efetuada no soro sanguíneo, onde os pesticidas são facilmente detectáveis. Pelo fato de ser possível, nesta mesma análise, a identificação de outros organoclorados, e devido à importância para a Saúde Pública, o estudo foi estendido também para suas determinações.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de soro sanguíneo de 28 habitantes residentes em casas tratadas com HCH (grupo 1) e de 23 habitantes residentes em casas não tratadas (grupo 2). O soro sanguíneo

das amostras coletadas no local foi extraído e encaminhado imediatamente ao laboratório para análise (tabelas 1 e 2).

O método empregado foi o de DALE & MILLES², onde os pesticidas são extraídos com hexano e a fase orgânica é concentrada e injetada no cromatógrafo para identificação e quantificação. Foi feita recuperação dos pesticidas em níveis de 1 e 2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ para verificar se as condições de extração estavam corretas, e os resultados foram de 85 e 90%, respectivamente.

Cromatografia em fase gasosa

Foram usados dois cromatógrafos com as seguintes especificações:

TABELA 1

Níveis de HCH em soro sanguíneo de moradores de casas tratadas (Grupo 1)

Amostra nº	Idade	Sexo	HCH total ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
1	25	fem.	10
2	56	masc.	35
3	40	fem.	5
4	51	fem.	2
5	16	fem.	1
6	37	fem.	8
7	21	masc.	1
8	40	masc.	30
9	30	masc.	1
10	19	masc.	18
11	16	fem.	1
12	42	masc.	10
13	35	fem.	10
14	37	fem.	15
15	31	fem.	20
16	34	fem.	10
17	62	fem.	10
18	58	masc.	15
19	12	masc.	10
20	38	fem.	10
21	44	fem.	10
22	39	masc.	1
23	12	masc.	8
24	56	masc.	1
25	4	masc.	2
26	36	fem.	2
27	53	fem.	10
28	39	masc.	8

Mediana = 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

a) Cromatógrafo Varian Aerograph 2100-00 com detector de captura de elétrons, fonte de trítium, equipado com coluna de vidro em forma de U, de 6 pés de comprimento por 1/4 de diâmetro interno com fase estacionária 1,3% de SF 96 mais 5,3 de QF1 em Supelcoport nas seguintes condições: temperatura da coluna, 190°C; temperatura do injetor, 210°C; temperatura do detector, 210°C; fluxo de nitrogênio, 40 ml/min.

b) Cromatógrafo CG 370 com detector de captura de elétrons, fonte de trítium, equipado com coluna espiralada de vidro, de 6 pés de comprimento por 1/8 de polegada de diâmetro interno com fase estacionária 5% de Ov 210 em Chromosorb WHP 80 a 100 mesh, nas seguintes condições: temperatura da coluna, 194°C; temperatura do injetor, 216°C; temperatura do detector, 218°C; fluxo de nitrogênio 40ml/min.

A sensibilidade dos aparelhos foi ajustada de maneira a se obter uma deflexão de 60% da escala do papel do registrador com 50 picogramas de Aldrin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados nas tabelas 1 e 2 mostram que os soros sanguíneos da população do grupo 1 apresentam níveis de HCH mais elevados do que os da do grupo 2. O valor mais alto encontrado foi de 35 µg/dl, o valor mínimo foi 1 µg/dl, e a mediana, 10 µg/dl. Estes valores não podem ser comparados com nenhum outro parâmetro biológico para controle de exposição a defensivos agrícolas, pois só existe para o isômero gama-HCH, em que o limite de tolerância biológica é de 20 µg/dl e o valor normal é menor ou igual a 0,4 µg/dl, no sangue².

TABELA 2

Níveis de HCH em soro sanguíneo de moradores de casas não tratadas (Grupo 2)

Amostra nº	Idade	Sexo	HCH total (µg/dl)
1	50	fem.	1
2	50	masc.	<1
3	38	masc.	2
4	17	fem.	2
5	27	fem.	3
6	18	fem.	1
7	49	masc.	1
8	39	fem.	1
9	40	masc.	1
10	31	fem.	4
11	15	fem.	1
12	77	fem.	5
13	52	fem.	2
14	42	fem.	1
15	30	fem.	2
16	29	fem.	<1
17	27	fem.	<1
18	67	masc.	1
19	16	fem.	3
20	55	masc.	4
21	56	fem.	<1
22	19	fem.	1
23	49	masc.	<1

Mediana = 1 µg/dl.

Outros pesticidas organoclorados também observados nas amostras foram Dieldrin e DDT (sob a forma de seu metabólito, pp'DDE), cujos valores são apresentados na tabela 3. Para o Dieldrin, o valor máximo foi de 8 µg/dl, o valor mínimo, menor que 1 µg/dl, e a mediana menor que 1 µg/dl (tab. 4). Observamos, em relação ao Dieldrin, que cinco pessoas apresentaram níveis mais elevados do pesticida no sangue, do que o valor normal, que é menor ou igual a 2 µg/dl².

No caso do DDT total, foi verificada a presença de seu metabólito, pp'DDE, num valor máximo de 100 µg/dl, mínimo de 1 µg/dl, e mediana de 31 µg/dl. Observamos que 52,9% das pessoas apresentaram níveis de DDT acima do normal², que é de 30 µg/dl. Entretanto, nenhuma delas

atingiu o limite de tolerância biológica, que é de 500 µg/dl. O valor da mediana foi mais alto do que o citado por BARQUET et alii¹, que é de 18 µg/dl.

Analisando os níveis de Dieldrin no soro sanguíneo das amostras, e comparando-os com os encontrados por LEAL et alii³, em soro de aplicadores de pesticidas, em Pernambuco, verificamos que estão bem abaixo dos citados por aquele autor; entretanto, isso não ocorre com relação aos selecionadores de semente (LEAL et alii³), que apresentaram níveis bem mais altos (até 34 µg/dl). Em relação ao pp'DDE, os níveis por nós encontrados e os de LEAL et alii estão acima do valor normal estabelecido pela legislação brasileira¹ em vigor, que é de 3 µg/dl para o DDT.

TABELA 3

Níveis de Dieldrin e pp'DDE em soro sanguíneo de moradores de casas tratadas (Grupo 1)

Amostra nº	Dieldrin (µg/dl)	pp'DDE (µg/dl)
1	1	85
2	5	70
3	5	45
4	<1	13
5	<1	21
6	<1	6
7	<1	50
8	5	96
9	1	20
10	1	15
11	<1	5
12	<1	35
13	<1	5
14	<1	41
15	1	39
16	<1	1
17	<1	46
18	<1	90
19	<1	55
20	<1	5
21	<1	28
22	1	36
23	<1	1
24	2	48
25	1	75
26	1	31
27	1	31
28	2	24

TABELA 4

Níveis de Dieldrin e pp'DDE em soro sanguíneo de moradores de casas não tratadas (Grupo 2)

Amostra nº	Dieldrin (µg/dl)	pp'DDE (µg/dl)
1	1	1
2	<1	5
3	2	20
4	<1	21
5	<1	27
6	1	6
7	1	21
8	<1	5
9	<1	32
10	<1	63
11	<1	3
12	3	74
13	1	48
14	<1	14
15	<1	54
16	<1	2
17	<1	53
18	2	83
19	1	16
20	8	68
21	<1	82
22	<1	43
23	<1	100

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que os moradores das casas tratadas com HCH apresentam grau de contaminação maior que o dos moradores das casas não tratadas. Para maior controle da população exposta a esse tipo de contaminação, são necessárias campanhas educativas que devem acompanhar o serviço de aplicação de pesticidas. Não se

deve alarmar a população, mas conscientizá-la dos riscos que corre se não tomar precauções adequadas.

A proibição pela legislação brasileira³ em vigor, em relação ao uso de pesticidas organoclorados na agricultura, provavelmente irá contribuir para que os níveis de Dieldrin e DDT no soro sanguíneo tendam a diminuir, no futuro.

RIALA6/622

LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Levels of hexachlorocyclohexane (HCH) in exposed people from a Chagas disease area in Alcândia, Go, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):19-24, 1987.

ABSTRACT: Levels of hexachlorocyclohexane (HCH) were determined in 51 serum specimens from people living in an area where Chagas disease was being controlled by house spraying with HCH to destroy the insect vectors: *Panstrongyllus megistus*, *Triatoma sordida* and *Triatoma infestans*. Samples were also collected from 28 persons whose houses had not been sprayed. There was a significant difference between the two groups. In the treatment group, the minimum level found was 1 µg/dl (ppb) and the maximum was 35 µg/dl (ppb) with a median of 10 µg/dl (ppb). In the people from unsprayed houses, the minimum was 1 µg/dl (ppb). The test was performed by gas-liquid chromatography. The presence of pp'DDE in all the 51 specimens and Dieldrin in 22 of them was detected. The results indicate that serum specimens from people living in the area contained organochlorine pesticides other than HCH. With the exception of two levels of HCH, all these results are below the limits of biological tolerance established by Brazilian laws for these pesticides.

DESCRIPTORS: organochlorine pesticide residues, detection in human blood serum; pesticide residues; gas-liquid chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARQUET, A.; MORGADE, C. & PFAFFENBERGER, C.D. — Determination of organochlorine pesticides and metabolites in drinking water, human blood serum, and adipose tissue. *J. Toxicol. environ. Health*, 7:469-79, 1981.
2. BRASIL. Leis, decretos etc. — Portaria n° 12, de 06 de julho de 1983, da Secretaria de Segurança e Medicina do Trabalho. *Diário Oficial*, Brasília, 14 jun. 1983. Seção I, p. 10288. Altera as Normas Regulamentadoras... e o Anexo VIII da NR 15 aprovados pela Portaria n° 3214 de 08 de junho de 1978...
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Portaria n° 329, de 02 de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 3 set. de 1985. Seção I, p. 12941. Altera as Normas Regulamentadoras da Portaria SNVS n° 10 de 08 de março de 1985.
4. DALE, W.E. & MILES, J.W. — Quantitative method for determination of DDT and DDT metabolites in blood serum. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 53:1287-92, 1970.
5. LEAL, W.S.; MACHADO, J.D. & LIMA, M.A. — Resíduos de pesticidas organoclorados em sangue de trabalhadores da agricultura de Pernambuco (Brasil). In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 8°, São Paulo, 1984. *Relatório*. São Paulo, Inst. Adolfo Lutz, 1984. p. 67-80.
6. PESSÔA, S.B. & MARTINS, A.V. — *Parasitologia médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1974. p. 143.

Recebido para publicação em 18 de março de 1987.

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO EM ÁGUAS NATURAIS*

Jorge José do Vale OLIVEIRA**
Maria Isabel VALLILO**
Nilva Aparecida R. PEDRO**
Odair ZENEBO**

RIALA6/623

OLIVEIRA, J.J.V.; VALLILO, M.I.; PEDRO, N.A.R. & ZENEBO, O. — Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas naturais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):25-30, 1987.

RESUMO: Foram feitos estudos comparativos entre quatro métodos para determinação de nitrato em amostras de águas naturais, colhidas em dez poços na cidade de São Paulo. Procurou-se destacar os problemas operacionais e os possíveis interferentes para cada método. Com base nos resultados obtidos, foi sugerido o método do ácido fenoldissulfônico como o mais apropriado para o uso em análises de rotina de amostras de água.

DESCRITORES: água natural, determinação de nitrato em; nitrato em água natural, determinação; métodos, estudo comparativo.

INTRODUÇÃO

Nitratos e óxidos de nitrogênio são reconhecidos como importantes poluentes em água e ar, respectivamente. Os nitratos estão presentes naturalmente em solos, águas, plantas e carnes, não excedendo 10 µg/l. Este nível pode ser aumentado pelo uso de fertilizantes nitrogenados⁶, proteínas em decomposição oriundas de plantas, animais, excrementos, e por resíduos provenientes de várias operações industriais^{2,3,10}.

Concentrações de nitratos e nitritos em alimento e água constituem um risco para a saúde dos adultos; porém, em crianças até 3 meses, o teor é crítico uma vez que o sistema enzimático do trato gastrointestinal não está totalmente desenvolvido e, nestas condições, a formação de metahemoglobina aumenta, resultando em condição clínica característica (meta-hemoglobinemia). Por esta razão, o "International Standards for Drinking Water" recomenda um nível de nitrato até 45mg/l, em águas potáveis^{3,5,10}.

Muitos métodos são citados na literatura para a determinação de nitrato. Alguns destes são baseados na nitração de compostos fenólicos, como o do ácido cromotrópico^{1,9}, do 2,4-xilenol^{2,7}, do ácido fenoldissulfônico^{1,4} e do resorcinol⁸, e outros são fundamentados na eletroquímica, como o do eletrodo seletivo e o da redução da coluna de cádmio¹. Uma determinação direta de nitrato pode ser efetuada pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta¹.

Com o objetivo de escolher a melhor conduta para determinar nitratos em amostras de águas naturais em trabalhos de rotina, foi proposto um estudo comparativo entre quatro métodos, levando em consideração facilidade de operação, estudo de interferências e obtenção de bons resultados na faixa de concentração estudada. Os métodos estudados foram: método do ácido fenoldissulfônico, da espectrofotometria direta na região do ultravioleta, do resorcinol e da redução em coluna de cádmio, sendo este último um método praticamente livre de interferentes.

* Realizado na Seção de Águas e na de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado na 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Brasília, 1987.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAIS

Foram analisadas 10 amostras de águas naturais colhidas de poços na cidade de São Paulo.

Aparelhagem

Espectrofotômetro*
Cubetas de 1,00 cm de caminho óptico
Potenciômetro**

Reagentes

Água bidestilada e desmineralizada
Ácido acético glacial
Ácido clorídrico (0,1N e 1,0N)
Ácido sulfanílico
Ácido sulfúrico (concentrado e fumegante)
Hidróxido de amônio a 10%
Hidróxido de sódio 12N

Solução-padrão de Nitrato de potássio
Nitrato de potássio 0,722g
Água até completar 1.000 ml
(1 ml desta solução corresponde a 0,01 mg de nitrogênio)

Solução estoque de nitrato de sódio (0,01 g/l)
Sulfato de cádmio a 20% (p/v)
Bastões de zinco
Solução de resorcinol a 5% (p/v)
Solução-tampão (pH 9,6-9,7)

Adicione 20 ml de ácido clorídrico concentrado a 500 ml de água, e agite. A seguir, adicione 50 ml de hidróxido de amônio concentrado e complete o volume até 1.000 ml, em balão volumétrico.

Solução de alfa-naftol
Aqueça, a 50°C, 50 ml de ácido acético em 360 ml de água. Transfira para um frasco escuro contendo 0,25 g de ácido sulfanílico e agite até completa dissolução. Adicione, sob agitação, 0,20 g de alfa-naftol, esfrie até a temperatura ambiente e adicione 90 ml de solução de hidróxido de amônio, a 10%. O pH da solução deve ficar em 4,0±0,5.

Solução de ácido fenoldissulfônico
Adicione 150 ml de ácido sulfúrico concentrado a 25 g de fenol, e agite. A seguir, adicione 75 ml de ácido sulfúrico fumegante (15% em SO₃) e aqueça a 100°C, por duas horas, em capela.

MÉTODOS

Método do ácido fenoldissulfônico

Curva-padrão — Pipete 50ml da solução estoque de nitrato de potássio em cápsula de porcelana e evapore até a secura, em banho-maria. Esfrie e adicione 2ml da solução de ácido fenoldissulfônico. Transfira para balão volumétrico de 500ml e complete o volume com água bidestilada e desmineralizada. Pipete alíquotas com concentração de 0 a 0,2mg de nitrogênio/nitrato para balões volumétricos de 100ml, adicione respectivamente, 1ml de ácido fenoldissulfônico, aproximadamente 20ml de água e solução de hidróxido de sódio 12N até desenvolvimento da cor amarela. Complete o volume com água e meça a transmitância a 400nm, usando um branco para calibração do espectrofotômetro.

Determinação de nitrato — Pipete 50ml de amostra e coloque em cápsula de porcelana. Evapore em banho-maria até secura, esfrie e adicione 1ml da solução de ácido fenoldissulfônico. Para desenvolvimento de cor e medida de transmitância proceda como descrito na curva-padrão. Determine a concentração de nitrato nas amostras, em termos de mg N/NO₃⁻, a partir da curva-padrão.

Método da espectrofotometria direta na região do ultravioleta

Curva-padrão — Pipete 50ml da solução estoque de nitrato de potássio e dilua até 500ml com água. Pipete alíquotas com concentração de 0 a 0,2mg de nitrogênio/nitrato em balões volumétricos de 50ml, adicione 1ml de ácido clorídrico 1M e complete o volume com água. Meça a transmitância a 220nm, usando um branco para calibração do espectrofotômetro.

Determinação de nitrato — Pipete 30ml da amostra em balão volumétrico de 50ml, adicione 1ml de ácido clorídrico 1 M e complete o volume com água. Para a medida de transmitância, proceda como na curva-padrão. Determine a concentração de nitrato nas amostras, em termos de mg N/NO₃⁻, a partir da curva-padrão.

Método do resorcinol

Curva-padrão — A partir da solução estoque de nitrato de potássio, pipete alíquotas com con-

* Varian Series 634.

** Methron Herisau.

centrações de 0 a 0,06mg de nitrogênio/nitrato, coloque em balões volumétricos de 50ml, adicione 1 ml de resorcinol a 5% e agite. A seguir, adicione lentamente 26ml de ácido sulfúrico concentrado, esfrie até a temperatura ambiente e complete o volume com água. Meça a transmitância a 360nm, usando um branco para calibração do espectrofotômetro.

Determinação de nitrato — Pipete 20ml de amostra em balão volumétrico de 50ml, adicione 1 ml de resorcinol a 5% e, lentamente, 26ml de ácido sulfúrico concentrado, complete o volume com água. Para a medida da transmitância, proceda como na curva-padrão. Determine a concentração de nitrato nas amostras, em termos de mg N/NO₃⁻, a partir da curva-padrão.

Método da redução em coluna de cádmio

Curva-padrão — A partir da solução estoque de nitrato de sódio, pipete alíquotas com concentrações de 4 a 40µg de nitrito e coloque em balão volumétrico de 25 ml, adicione 5ml da solução tampão, 10ml da solução alfa-naftol e complete o volume com água. Deixe durante 30 minutos em banho-maria de 25° a 30°C, esfrie até a temperatura ambiente e meça a transmitância a 474nm, usando um branco para calibração do espectrofotômetro.

Preparo da coluna de cádmio — Coloque bastão de zinco em 100ml de solução de sulfato de cádmio a 20%; após 3 horas, remova o depósito esponjoso de cádmio, triture com 250ml de água e

passe em peneira de 20 a 40 malhas. Transfira a esponja de cádmio para uma coluna de vidro (1,5cm de diâmetro e 12cm de comprimento), à qual esteja adaptado um funil de separação de 50ml e mantenha a coluna com água. Antes da determinação de nitrato, lave a coluna com 25 ml de ácido clorídrico 0,1N, a seguir com 50ml de água e, finalmente, com 25 ml de solução tampão diluída 10 vezes.

Eficiência da coluna — Teste a eficiência da coluna, passando solução de nitrato de potássio através da mesma, e determine a quantidade de nitrito, a partir da curva-padrão. Os dados obtidos encontram-se na tabela 1.

Determinação do nitrato — Pipete um volume adequado de amostra e coloque no funil de separação da coluna, adicione 5ml de solução-tampão e passe pela coluna a uma velocidade de 5 ml/min. A seguir, passe água até recolher 100ml de eluído. Pipete 10ml do eluído para um balão volumétrico de 25ml. Para desenvolvimento de cor e medida de transmitância, proceda como descrito na curva-padrão. Determine o teor de nitrito pela curva-padrão.

RESULTADOS

Os resultados da análise das amostras pelos quatro métodos citados, encontram-se relacionados na tabela 2 da página seguinte.

TABELA 1

Recuperação da coluna de cádmio

Quantidade de NO ₃ ⁻ passado na coluna µg	Quantidade teórica correspondente a NO ₂ ⁻ µg	Quantidade encontrada de NO ₂ ⁻ µg	Recuperação da coluna %
100	74,19	74,62	100,59
140	103,87	103,66	99,80
160	118,70	121,09	102,02
200	148,38	154,18	103,91
300	222,58	216,77	97,39

TABELA 2

*Resultados das determinações de nitrato pelos métodos comparativos**

Amostra Nº	Método do ácido fenoldissulfônico (N/NO ₃ ⁻) mg/l	Método do Resorcinol (N/NO ₃ ⁻) mg/l	Método espectrofotométrico (N/NO ₃ ⁻) mg/l	Método de redução da coluna de cádmio (N/NO ₃ ⁻) mg/l
1	1,61	1,81	2,00	1,73
2	2,25	2,33	2,39	2,21
3	0,56	0,93	0,80	0,97
4	1,63	1,95	1,88	1,69
5	1,22	1,29	1,37	1,34
6	13,99	12,82	12,71	11,66
7	1,71	1,87	1,98	1,88
8	0,14	0,08	0,36	0,20
9	2,36	1,90	2,67	2,53
10	1,73	1,95	2,03	1,91

* Média de 3 valores.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os valores obtidos para as determinações de nitrato, pelos métodos estudados, apresentaram-se satisfatórios entre si, como mostra a tabela 2, evidenciando que qualquer um dos métodos poderia ser recomendado para análise de rotina. Restrições, porém, podem ser feitas com relação à operacionalidade e interferências de cada método.

O método do ácido fenoldissulfônico apresenta a desvantagem de, além de utilizar volume relativamente grande de amostra, envolve várias etapas de reações que podem levar a erros por parte do analista, tendo porém a vantagem da grande estabilidade do composto final obtido, não requerendo controle rígido do tempo de determinação. Altos teores de cloreto podem interferir nesta dosagem de nitrato porém, para concentrações até 5.000mg/l, não se observou nenhuma interferência.

Com relação ao método da espectrofotometria direta na região do ultravioleta, apesar de ser rápido e simples, apresenta desvantagem em sua aplicabilidade por requerer que as amostras sejam isentas de matéria orgânica interferente, condição pouco provável de se ter na prática. Em nosso trabalho, obtiveram-se teores de matéria orgânica abaixo de 0,50mg/l, inferiores aos citados na literatura.

Quanto ao método do resorcinol, sua grande desvantagem é com relação à necessidade de ma-

nipulação com ácido sulfúrico concentrado. Amostras de água freqüentemente apresentam concentrações significativas de ions de ferro (II) e ferro (III), que são interferentes neste método, como mostram as figuras 1 e 2 da página seguinte, ocasionando resultados mais elevados que os esperados. Nas amostras analisadas foram obtidos valores de ferro-total abaixo de 0,20mg/l.

O método da redução em coluna de cádmio apresenta algumas restrições, apesar de ser considerado padrão, em virtude de não apresentar problemas de interferência, excetuando a presença de nitrito, que pode ser eliminada através da diferença da concentração de nitrito antes e depois de passar pela coluna de cádmio, e pode ser utilizado praticamente para todo tipo de amostra. Cuidados devem ser tomados com relação à sua operacionalidade: evitar que a coluna seque, tempo de escoamento, de 20 minutos, e checagem periódica da eficiência da coluna.

Com base nos estudos realizados, levando em consideração em primeiro lugar o problema de interferentes e em segundo lugar a operacionalidade, o método mais apropriado para análises de rotina de águas naturais é o do ácido fenoldissulfônico, pois estas amostras dificilmente apresentam teores elevados de cloretos. Sugerimos, como método alternativo, o da redução em coluna de cádmio, para amostras que apresentam teores elevados de cloretos.

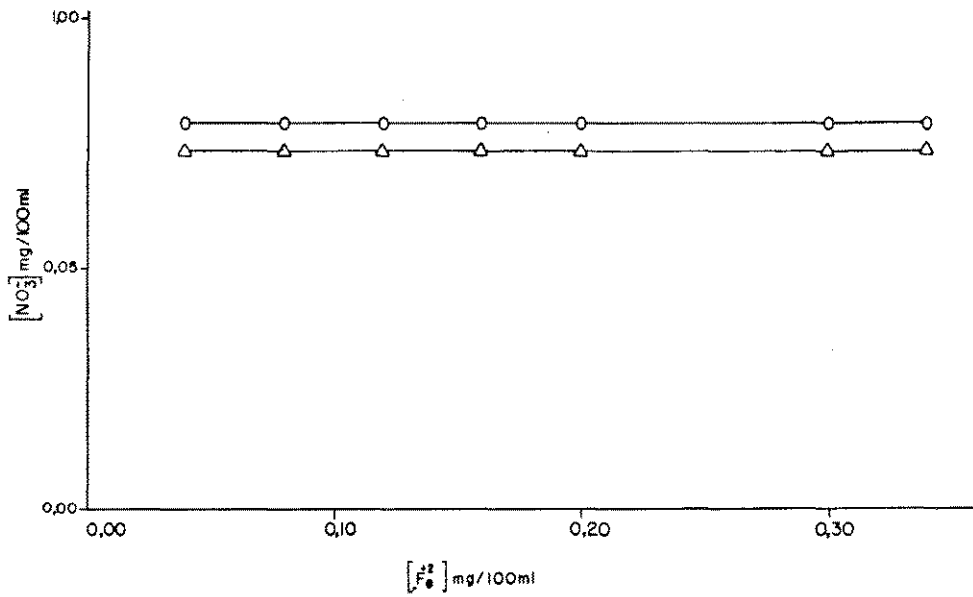
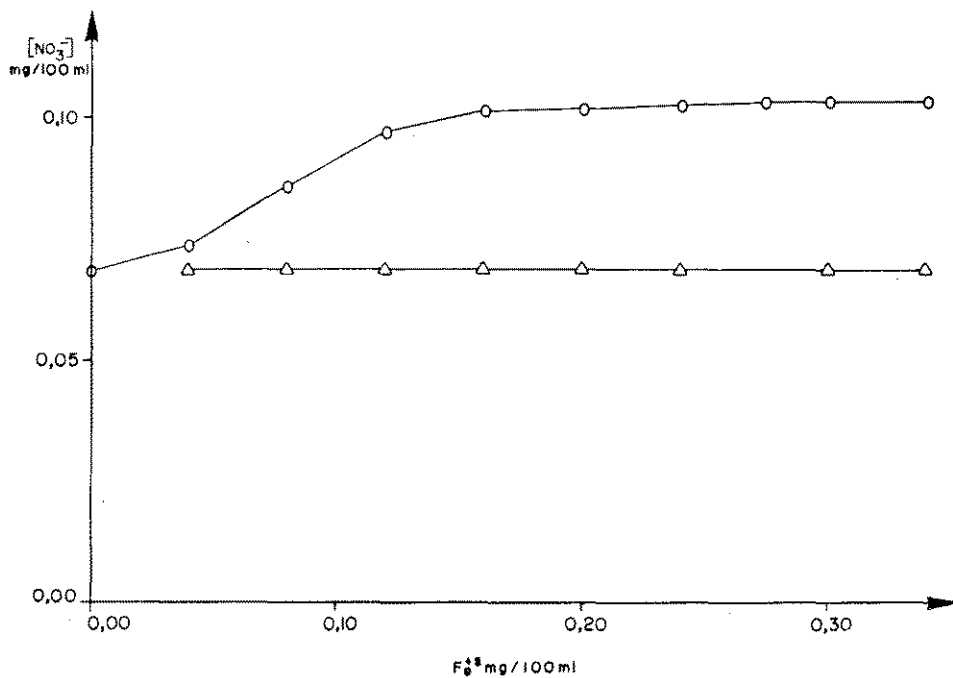


FIGURA 1 — Interferência do íon Fe (II) na determinação de NO_3^- pelo método do resorcinol.



O- CONCENTRAÇÃO REAL DE NO_3^- (sem Fe^{3+})
 Δ- DESVIO DA CONCENTRAÇÃO REAL DE NO_3^- COM ADIÇÃO DE Fe^{3+}

FIGURA 2 — Interferência do íon Fe (III) na determinação de NO_3^- pelo método do resorcinol.

OLIVEIRA, J.J.V.; VALLILO, M.I.; PEDRO, N.A.R. & ZENEBO, O. — Comparative study of methods for determination of nitrate in water from wells drilled in metropolitan São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):25-30, 1987.

ABSTRACT: Four methods for nitrate determination in natural waters were employed in water samples from 10 wells drilled in Metropolitan São Paulo. The operational problems and the occurrence of interference were examined for each of the four methods. The phenoldisulfonic acid method is suggested for routine analysis of natural water samples.

DESCRIPTORS: natural water, nitrate determination in; nitrate in natural water, comparative methods of determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 16th ed. Washington, APHA, 1985. p. 391-404.
2. BARNES, H. — A modified 2:5-xenol method for nitrate estimations. *Analyst.*, 75:388-92, 1950.
3. BURDEN, E.H.W.J. — The toxicology of nitrates and nitrites with particular reference to the potability of water supplies. *Analyst*, 86:429-33, 1961.
4. HORA, F.B. & WEBBE, P.J. — A source of serious error in the determination of nitrates by the phenoldisulphonic acid method and its remedy. *Analyst.*, 85:567-9, 1960.
5. HUNTER, H. & COMLY, Y.D. — Cyanosis in infants caused by nitrites in well water. *J. amer. med. Assoc.*, 129:112-6, 1945.
6. KHOL, D.H.; SHEARER, G.B. & COMMONER, B. — Fertilizer nitrogen: contribution to nitrate in surface water in a corn belt watershed. *Science.*, New Y., 174:1331-4, 1971.
7. MONTGOMERY, H.A.C. & DYMOCK, J.F. — The rapid determination of nitrate in fresh and saline waters. *Analyst.*, 87:374-8, 1962.
8. WELGHE, N. & CLAEYS, A. — Rapid spectrophotometric determination of nitrates in mineral waters with resorcionol. *Analyst.*, 110:313-4, 1985.
9. WEST, P.W. & RAMACHANDRAN T.P. — Spectrophotometric determination of nitrates using chromotropic acid, *Anal. Chim. Acta*, 35:317-24, 1966.
10. WHO TASK GROUP ON ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA FOR NITRATES, NITRITES AND N-NITROSO COMPOUNDS. Lyon, 1976. *Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds*. Geneva, WHO, 1978. p. 17, 31, 32. (Environmental Health Criteria 5)

Recebido para publicação em 3 de abril de 1987.

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM
DIPHThERIAE* ISOLADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL,
NO PERÍODO DE 1980 A 1986*

Cláudio Tavares SACCHI**
Solange Rodrigues RAMOS**
Carmo Elias Andrade MELLES**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Maria Lúcia Cecconi TONDELLA**
Augusto de Escragnole TAUNAY**

RIALA 6/624

SACCHI, C.T.; RAMOS, S.R.; MELLES, C.E.A.; BRANDILEONE, M.C.C.;
TONDELLA, M.L.C. & TAUNAY, A.E. — Estudo bacteriológico de cepas de
Corynebacterium diphtheriae isoladas no Estado de São Paulo, Brasil, no período de
1980 a 1986. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 47(1/2):31-37, 1987.

RESUMO: Foram analisadas as características bioquímicas de 386 cepas de
Corynebacterium jiphtheriae isoladas na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz,
São Paulo, no período de 1980 a 1986. Verificou-se que 58,3% destas cepas foram capazes de
fermentar a sacarose. O biotipo mais freqüente foi o *mitis* (52,2%), seguido pelos biotipos
intermedius (26,4%), *gravis* (9,9%) e de cepas de comportamento atípico (11,7%). Das cepas
pertencentes ao biotipo *intermedius*, 75,5% foram capazes de fermentar a sacarose. Com
relação à produção de toxina, detectada pelo método de Elek, verificou-se que 92,8% das
cepas foram toxigênicas e que 97,3% das cepas fermentadoras de sacarose produziram
toxina.

DESCRITORES: *Corynebacterium diphtheriae*, biotipos.

INTRODUÇÃO

As características bioquímicas do *Corynebacterium diphtheriae* são bastante conhecidas. Com relação à fermentação de carboidratos, alguns deles são usados para diferenciar o *C. diphtheriae* de outras espécies normalmente não patogênicas. Dentre os carboidratos utilizados, encontramos a sacarose que sempre foi considerada, nos testes de fermentação, o açúcar-chave para a identificação do *C. diphtheriae*.

Na última edição do manual Bergey¹⁰, de 1986, o *C. diphtheriae* ainda é considerado como não fermentador da sacarose, sendo raras as cepas capazes de utilizá-la. No entanto, em 1943, PESTA-

NA¹² já mostrava que de 1452 cepas isoladas e identificadas no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, 12,6% fermentaram a sacarose. Em 1957, CHRISTOVÃO^{5,6} e TOPLEY¹⁹ relataram uma positividade de 20% em cepas de *C. diphtheriae*, também isoladas em São Paulo. Os mesmos autores, analisando extensa literatura, mostraram que os dados não eram concordantes, e que a variabilidade dos resultados de fermentação da sacarose muitas vezes estava relacionada com o meio base utilizado, a pureza do açúcar ou a pouca sensibilidade do indicador de pH utilizado.

RASKIN¹³, em 1978, analisando 254 cepas de *C. diphtheriae* isoladas e identificadas no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, verificou que 59,8% das mesmas fermentaram a sacarose.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Fica assim bem demonstrada a importância do trabalho inicial de PESTANA & FERREIRA¹², que teve sua observação confirmada por CHRISTOVÃO^{5,6} e RASKIN et alii¹³. Atualmente, já se admite que há cepas de *C. diphtheriae* fermentadoras de sacarose e que esta característica está associada apenas aos biotipos *mitis* e *gravis*^{1,2,3,8,15,17}.

No período de 1980 a 1986, tivemos a oportunidade de examinar 386 cepas de *C. diphtheriae* que foram submetidas a várias provas bioquímicas, e pesquisa de toxigenicidade na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo. Este estudo teve como objetivo traçar o perfil bioquímico, com atenção especial para a capacidade de fermentar a sacarose, e toxigênico, bem como conhecer a incidência dos diferentes biotipos de *C. diphtheriae* em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das cepas — As 386 cepas de *C. diphtheriae* analisadas foram obtidas a partir de swabs nasais e faríngeos, submetidos ao diagnóstico bacteriológico pela Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz no período de 1980 a 1986, de pacientes com suspeita clínica de difteria, comunicantes e portadores encaminhados ao Hospital Emílio Ribas, São Paulo.

Isolamento — O material, uma vez colhido, foi semeado em meio de Loeffler e incubado por um período de 8 a 12 horas, em estufa a 37°C. Após este período, foi feito esfregaço do crescimento bacteriano em lâmina, o qual foi corado pelo método de Albert Laybourn⁷, com a finalidade de demonstrar a presença de bacilos com características morfológicas e tintoriais de *Corynebacterium* sp. Independentemente da positividade ou não deste exame bacterioscópico presuntivo, procedeu-se à cultura, a partir do meio de Loeffler, que foi feita em placas de ágar-sangue-cistina-telurito (CTBA)¹⁶, as quais foram incubadas, por 48 horas, em estufa a 37°C. Destas placas, várias colônias suspeitas foram subcultivadas em meio de Loeffler e incubadas em estufa a 37°C, por 18 horas. Após incubação, esfregaços corados pelo método de Albert Laybourn foram usados para confirmar as características morfológicas e tintoriais destes microrganismos isolados.

Identificação — Para a identificação bioquímica, biotipagem e pesquisa de toxigenicidade, usou-se como inóculo uma cultura em ágar Mueller-Hinton incubada por 18 horas em estufa a 37°C. Parte dos testes bioquímicos utilizados foram descritos em publicação anterior¹⁴, aos quais foram acrescidas a capacidade de hidrolizar a pirazinamida e pesquisa da atividade hemolítica. A pesquisa de pirazinamida carboxilamidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) foi feita pelo método rápido descrito por SULEA et alii¹⁸. Como controle positivo da reação usou-se uma cepa de *C. xerosis*, KC-1368*. A atividade hemolítica foi observada em placas de ágar sangue (10% de sangue desfibrinado de coelho), com leituras feitas após 24 e 48 horas de incubação, em estufa a 37°C.

Biotipagem — Os biotipos de *C. diphtheriae* foram caracterizados segundo o esquema preconizado por SARAGEA et alii¹⁶ onde foram analisadas as características morfológicas em CTBA, tipo de crescimento em caldo nutritivo, fermentação do amido e glicogênio, redução de nitrato e atividade hemolítica.

RESULTADOS

Das 386 amostras de *C. diphtheriae*, 58,29% foram capazes de fermentar a sacarose (tabela 1). Com relação à frequência dos biotipos, 52,21% das cepas pertenceram ao biotipo *mitis*, 26,42% ao biotipo *intermedius*, 9,87% ao biotipo *gravis* e 11,69% corresponderam a cepas que apresentaram um padrão de comportamento atípico (tabela 2).

Quanto à utilização da sacarose, a maior frequência foi encontrada no biotipo *intermedius*, 75,49%, seguido pelos biotipos *gravis*, 71,05%, cepas de comportamento atípico, 57,78% e *mitis*, 47,26% (tabela 1).

Com relação à produção de toxina, verificou-se que 92,77% das cepas foram toxigênicas, sendo que 99,02% das cepas pertencentes ao biotipo *intermedius* foram toxigênicas (tabela 3).

Com relação ao tipo de nitrato redutase, 100% das cepas eram do tipo A, e apenas 0,52% das cepas não apresentavam esta enzima.

* Cepa cedida pela Dra. Frances O. Sottnek, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, EUA.

TABELA 1

Distribuição anual de biotipos de *C. diphtheriae* fermentadores da sacarose

Biotipos	1980		1981		1982		1983		1984		1985		1986		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>mitis</i>	29	63,04	21	50,0	6	54,54	7	43,75	14	45,16	9	28,12	9	39,13	95	47,26
<i>gravis</i>	5	83,33	7	87,5	0	—	4	66,23	9	69,23	0	—	2	50,0	27	71,05
<i>intermedius</i>	4	100,00	32	86,49	3	50,0	5	31,25	9	90,0	20	90,91	4	57,14	77	75,49
Atípicos	9	69,23	8	50,0	1	100,0	0	—	3	60,0	0	—	5	71,43	26	57,78
Total	47	68,11	68	66,02	10	55,55	16	41,02	35	59,32	29	50,88	20	48,78	225	58,29

TABELA 2

Biotipos de C. diphtheriae estudados durante o período de 1980 a 1986.

Ano	Biotipos								Total de biotipos
	<i>mitis</i>		<i>gravis</i>		<i>intermedius</i>		atípicos		
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
1980	46	66,67	6	8,7	4	5,8	13	18,83	69
1981	42	41,18	8	7,8	37	35,92	16	15,73	103
1982	11	61,11	0	—	6	33,33	1	5,55	18
1983	16	41,03	6	15,38	16	41,03	1	2,56	39
1984	31	52,54	13	22,03	10	16,95	5	8,48	59
1985	32	56,14	1	1,75	22	38,6	2	3,51	57
1986	23	56,1	4	9,76	7	17,07	7	17,07	41
Total	201	52,21	38	9,87	102	26,42	45	11,69	386

TABELA 3

Distribuição anual de biotipos de C. diphtheriae toxigênicos*

Anos	<i>mitis</i> tox ⁺		<i>gravis</i> tox ⁺		<i>intermedius</i> tox ⁺		atípicos tox ⁺		Total de biotipos tox ⁺	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
1980	43	93,48	6	100,00	4	100,00	13	100,00	66	95,65
1981	41	97,62	8	100,00	37	100,00	16	100,00	102	99,03
1982	10	90,91	0	—	6	100,00	1	100,00	17	94,44
1983	14	87,5	6	100,00	15	92,75	1	100,00	36	92,30
1984	27	87,1	10	76,92	10	100,00	5	100,00	52	88,14
1985	29	90,62	0	—	22	100,00	1	50,0	52	91,23
1986	19	82,61	1	25,0	7	100,00	6	85,71	33	80,49
Total	183	91,04	31	81,57	101	99,02	43	95,56	358	92,77

* A pesquisa de toxigenicidade foi feita pelo método de Elek.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A percentagem de cepas fermentadoras da sacarose dentre as 386 analisadas foi alta, 58,29%, mostrando ser uma característica importante dos bacilos diftéricos em nosso meio.

Um estudo da incidência de tal positividade, durante os 7 anos analisados, mostra que esta positividade sofreu variações não significativas.

Como pode ser observado na tabela 4, dentre as cepas fermentadoras da sacarose, 219, ou seja, 97,33%, apresentaram prova de toxigenicidade positiva e apenas 6 (2,67%) não foram toxigêni-

cas. Foi assim constatado que a percentagem de cepas fermentadoras da sacarose e toxigênicas permanece elevada¹³.

A alta incidência de cepas capazes de utilizar a sacarose pode estar ligada a uma característica regional, uma vez que não há relatos na literatura referentes a este tipo de frequência em outros países.

Ainda, com relação à fermentação da sacarose, a maior frequência foi para o biotipo *intermedius*, 75,49%, seguido pelos biotipos *gravis*, 71,05%, cepas de comportamento atípico, 57,78%, e *mitis*, 47,26%. Estes dados diferem

TABELA 4

Correlação entre a fermentação da sacarose e a toxigenidade de *C. diphtheriae*

Toxigenicidade	Fermentação da sacarose				Total de cepas	
	Positiva		Negativa		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
Positiva	219	97,33	139	86,34	358	92,75
Negativa	6	2,67	22	13,66	28	2,25
Total de cepas	225	58,29	161	41,71	386	--

dos relatos da literatura internacional que se refere ao fato, como raro, e assinalam nunca ter sido isolada uma cepa fermentadora da sacarose pertencente ao biotipo *intermedius*.

Com relação às cepas produtoras de nitrato-redutase, verificamos que 100% delas apresentaram enzima pertencente ao tipo A. A variedade nitrato-redutase negativa, o *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti*, foi extremamente rara, tendo sido isoladas apenas 2 cepas (0,52%), durante o período de 7 anos.

Apesar de ter havido uma variação dos biotipos no decorrer dos 7 anos (1980 a 1986), o biotipo *mitis* sempre foi o de maior incidência e o *gravis* de incidência mais baixa, com exceção das cepas atípicas.

Dentre as 201 cepas pertencentes ao biotipo *mitis*, 91,04% foram toxigênicas. Este comportamento difere muito do apresentado por cepas do biotipo *mitis* isoladas em outros países. No Canadá, apenas 5% das cepas do biotipo *mitis* isoladas entre 1967 e 1971 foram toxigênicas⁹. Porém, a percentagem das cepas toxigênicas pertencentes ao biotipo *mitis*, nos Estados Unidos da América, variou muito, apresentando uma queda significativa no decorrer de 14 anos analisados, sendo de 14% no período de 1971 a 1975⁹.

A suposição de haver uma correlação entre o biotipo e a gravidade da doença, hoje, já não apresenta consistência, pois todos os biotipos po-

dem ser toxigênicos ou não, causando mal clínico de intensidade variável¹⁶. No entanto, a incidência dos diferentes biotipos pode apresentar valor epidemiológico, pois a frequência deles, em épocas epidêmicas, é maior para o *gravis*, seguido do *intermedius*¹⁶.

Em alguns países da Europa^{15,16,20}, durante os últimos 20 anos, o biotipo *gravis* foi o único isolado em epidemias, enquanto, no período pós-epidêmico, a maior frequência foi para o *intermedius*. O biotipo *mitis* tornou-se prevalente somente quando a difteria passou a ser endêmica. Para estes países a ocorrência de cepas do biotipo *gravis*, e toxigênicas, representa um indicador epidemiológico implicando em medidas profiláticas imediatas^{3,9,11}. Já nos Estados Unidos da América, em recentes surtos investigados, o biotipo *intermedius* toxigênico prevaleceu, porém, em períodos pós-epidêmicos o biotipo *mitis* continuou sendo o de maior incidência^{15,16,20}.

À semelhança do que tem ocorrido em diferentes países, a prevalência no nosso meio do biotipo *mitis* nos leva a crer que a difteria se encontra sob a forma endêmica. Uma possível alteração na incidência dos biotipos *gravis* e *intermedius* poderia ter algum significado epidemiológico. A determinação de lisotipos, bacteriocinotipos ou de marcadores moleculares seria necessária para uma melhor caracterização das cepas epidêmicas de *C. diphtheriae*.

SACCHI, C.T.; RAMOS, S.R.; MELLES, C.E.A.; BRANDILEONE, M.C.C.; TONDELLA, M.L.C. & TAUNAY, A.E. — Bacteriological study of strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in São Paulo State, during the period 1980-1986. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):31-37, 1987.

ABSTRACT: A biochemical study was made of 386 strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated at the Central Public Health Laboratory for the State of São Paulo in the period 1980-1986. Saccharose was fermented by 58.3% of the strains. The most frequent biotype was *mitis* (52.2%) while *intermedius* and *gravis* showed frequencies of 26.4% and 9.9%, respectively, while 11.7% were atypical. Of the *intermedius* type strains, 75.5% fermented saccharose. Elek's method showed that 92.8% of the strains of all types were toxigenic and that 97.3% of the saccharose-fermenting strains were toxigenic.

DESCRIPTORS: *Corynebacterium diphtheriae*, biotypes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKSDALE, L. — The genus *Corynebacterium*. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G., ed. — *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin, Springer-Verlag, 1981. p. 1827-37.
2. BEBEAR, C. — Corynébactéries: In: LE MINOR, L. & VÉRON, M. — *Bactériologie Médicale*. 2^e tirage. Paris, Flammarion, 1984. p. 642-56.
3. BROOKS, G.F.; BENNETT, V. & FELDMAN, R.A. — Diphtheria in the United States, 1959-1970. *J. infect. Dis.*, 129(2): 172-8, 1974.
4. BROOKS, R. — *Guidelines for the laboratory diagnosis of diphtheria*. [Geneva] WHO [1981]. 27 p. (LAB/81.7).
5. CHRISTOVÃO, D.A. — Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. I — Fermentação da sacarose por bacilos diftéricos virulentos isolados em São Paulo. *Arq. Hig. Saúde Pública*, São Paulo, 11: 97-114, 1957.
6. CHRISTOVÃO, D.A. — Estudo sobre *Corynebacterium diphtheriae*. II — Observações sobre bacilos diftéricos e difteróides isolados em São Paulo aspectos morfológicos, propriedades fermentativas, virulência e frequência dos tipos de *Corynebacterium diphtheriae* encontrados. *Arq. Hig. Saúde Pública*, São Paulo, 11: 115-34, 1957.
7. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. — *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1975. p. 161-4.
8. COYLE, M.B. & TOMPKINS, — *Corynebacteria*. In: LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J., Jr., & TRUANT, J.P. — *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. p. 131-8.
9. DIXON, J.M.S. — Diphtheria in North America. *J. Hyg., Camb.*, 93: 419-32, 1984.
10. JONES, D. & COLLINS, M.D. — Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1986. v. 2, p. 1261-76.
11. McCLOSKEY, R.V.; SARAGEA, A. & MAXIMESCU, P. — Phage typing in diphtheria outbreaks in the southwestern United States, 1968-1971. *J. infect. Dis.*, 126(2): 196-9, 1972.
12. PESTANA, B.R. & FERREIRA, M.P.G. — Considerações sobre algumas propriedades bioquímicas do bacilo da difteria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3:(1): 32-43, 1943.
13. RASKIN, M.; PESSÔA, G.V.A.; CALZADA, C.T.; LEE, I.M.L.; MELLES, C.E.A. & SAKATA, E.E. — Fermentação da sacarose e toxigenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1): 29-32, 1978.
14. SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. — *Corynebacterium diphtheriae* isolado de sangue. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1): 73-9, 1985.
15. SARAGEA, A.; CARRAZ, M. & GUILLERMET, F. — Analyse des propriétés biologiques d'une collection de souches de *Corynebacterium diphtheriae* isolées au sud de la France entre 1955-1968. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 5(2): 203-11, 1972.
16. 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.

SACCHI, C.T.; RAMOS, S.R.; MELLES, C.E.A.; BRANDILEONE, M.C.C.; TONDELLA, M.L.C. & TAUNAY, A.E. — Estudo bacteriológico de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1980 a 1986. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):31-37, 1987.

17. SOTTNEK, F.O. & MILLER, J.M. — *Isolation and identification of Corynebacterium diphtheriae*. Revised ed. Atlanta, Georgia, Centers for Disease Control, 1982. 14 p.
18. SULEA, I.T.; POLLICE, M.C. & BARKSDALE, L. — Pyrazine carboxylamidase activity in *Corinebacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30(2): 466-72, 1980.
19. TOPLEY, W.W.C. — *Toplay and Wilson's principles of bacteriology and immunity*, 6th ed. London, Edward Arnold, 1975. p.618.
20. ZAMIRI, I.; McENTERGART, M.G. & SARA-GEA, A. — Diphtheria in Iran. *J. Hyg., Camb.*, 70: 619-25, 1972.

Recebido para publicação em 6 de abril de 1987.



INTRODUÇÃO DA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA NA DETECÇÃO DA CAFEÍNA EM GUARANÁ*

Mariangela T. AURICCHIO**
Mônica A. BATISTIC**
Vânia R. HOPPEN**

RIALA6/625

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & HOPPEN, V.R. — Introdução da técnica espectrofotométrica na detecção da cafeína em guaraná. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):39-44, 1987.

RESUMO: Foram comparados os resultados da determinação quantitativa da cafeína em guaraná de acordo com o método gravimétrico descrito na Farmacopéia Brasileira, 3ª edição, com os da determinação espectrofotométrica dos resíduos obtidos dissolvidos em ácido clorídrico 0,1 N, com leitura a 273 nm. A presença de outras substâncias de natureza não xantínica no resíduo foi mostrada através de cromatografia em camada delgada, usando-se fases móveis de diferentes polaridades. Os valores obtidos por espectrofotometria foram sempre menores do que os obtidos por gravimetria.

DESCRIPTORIOS: guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), determinação de cafeína em; cafeína, determinação em guaraná; espectrofotometria.

INTRODUÇÃO

O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) é uma planta nativa característica do norte da América do Sul², tendo seu uso difundido como tônico, estomáquico e estimulante⁵.

As primeiras notícias de seu estudo químico foram dadas por Theodor Martius, segundo CAGNO², 1942. Posteriormente, foram realizadas várias pesquisas visando a caracterização dos componentes químicos do guaraná. Isolou-se, dessa forma, um composto denominado inicialmente de guaranina, que mais tarde ficou demonstrado tratar-se de cafeína, cujo teor tem sido utilizado como parâmetro de qualidade do produto vegetal². A quantificação da cafeína em guaraná, entretanto, tem sido realizada apenas através da determinação gravimétrica^{2,3,4,6} embora alguns autores¹⁶ tenham utilizado métodos espectrofotométricos. Muitos métodos analíticos existem, para quantificação da cafeína e/ou teobromina e teofilina em café, chá, chocolate^{8,9,12}. Estes métodos incluem a cromatografia em fase gasosa e cromatografia líquida de alta resolução^{1,4} que, no entan-

to, não têm sido aplicados ao estudo do guaraná, pois a maioria dos laboratórios brasileiros não dispõe destes equipamentos especializados.

Mais recentemente, Simão et alii¹⁵ assinalaram a importância da detecção do pigmento vermelho, componente secundário do guaraná, para confirmação do seu grau de pureza.

A Farmacopéia Brasileira^{7,13} tem sido ao longo de suas revisões o único Código Oficial que apresenta monografia para guaraná e, em sua última edição (1977)⁶, estabelece para sementes de guaraná teores de cafeína que variam de 3,25% a 6,98%.

A determinação do teor de trimetilxantina (cafeína) em guaraná baseia-se no tratamento do pó da droga com carbonato de sódio e óxido de chumbo, seguido da extração com clorofórmio em aparelho de Soxhlet. O resíduo assim obtido é pesado e o resultado final é expresso em porcentagem de cafeína. Observa-se, no entanto, que o aspecto do resíduo é heterogêneo, sendo formado por cristais aciculares característicos da cafeína e

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

por uma massa amarelo-pálida, demonstrando ser a extração não seletiva para cafeína. Tal constatação levou-nos a considerar a determinação espectrofotométrica deste resíduo como uma possibilidade de se quantificar seletivamente a cafeína presente no mesmo, devido à sua simplicidade, rapidez e seletividade, podendo ser realizada em qualquer laboratório. Como última etapa do estudo, foram realizadas cromatografias em camada delgada em diferentes fases móveis para comprovação da presença de outras substâncias.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram estudadas 29 amostras de pó de guaraná, recebidas pela Seção de Farmacognosia para análises fiscais e de orientação.

Método para determinação gravimétrica e espectrofotométrica

Para a extração da cafeína do pó de guaraná foi empregado o método descrito na Farmacopéia Brasileira, 3.^a edição⁶.

O resíduo obtido pela análise gravimétrica foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com solução de ácido clorídrico 0,1 N; a partir desta solução foram feitas diluições de modo a obter-se uma solução final com concentração de cafeína de 10 µg/ml, a qual foi utilizada para leitura de U.V. a 273 nm.

Método para cromatografia em camada delgada

Foram desenvolvidas cromatografias em camada delgada nos resíduos obtidos nas análises gravimétricas visando-se, primeiramente, a identificação da cafeína¹⁶ (Sistema I). Posteriormente, foram utilizados outros sistemas cromatográficos com diferentes polaridades na fase móvel, com o objetivo de observar o comportamento das outras substâncias presentes no resíduo juntamente com a cafeína (Sistemas II, III, IV, V, VI).

Sistema I

As placas sílica gel 60 GF₂₅₄ foram submetidas à atmosfera amoniacal em cuba de vidro por 20 minutos, à temperatura ambiente.

As amostras a serem aplicadas consistiram do resíduo obtido por extração da trimetilxantina segundo a técnica oficial, dissolvido em 1 ml de clorofórmio.

Foram dissolvidas cerca de 20 mg de cafeína pa-

drão (cafeína anidra — USP) em 1 ml de clorofórmio (solução-padrão).

A fase móvel empregada foi clorofórmio-etanol (99:1).

O desenvolvimento foi unidimensional de 15 cm e cuba com saturação total. Após o desenvolvimento, a placa foi seca ao ar por 30 minutos.

A revelação foi obtida empregando-se, primeiramente, 10 ml da solução I e após 2 minutos, 5 a 10 ml da solução II (Reativo n.º 41), segundo STAHL et alii¹⁶:

Solução I— Dissolver 1 g de iodeto de potássio e 2 g de iodo em 100 ml de etanol a 96%.

Solução II— Misturar 5 ml de ácido clorídrico a 25% em etanol a 96%.

Sistemas II, III, IV, V, VI

As placas de sílica gel GF₂₅₄ foram ativadas a 105°C por uma hora e as amostras foram aplicadas juntamente com o padrão de cafeína, como descrito acima no Sistema I. O desenvolvimento foi unidimensional, ascendente de 15 cm, com cuba saturada por uma hora. A revelação foi feita com iodo sublimado.

As diferentes fases móveis utilizadas nos Sistemas II, III, IV, V e VI assim como as respectivas proporções, encontram-se relacionadas na tabela 1.

TABELA 1

Fases móveis que foram utilizadas para cromatografia em camada delgada do resíduo obtido da amostra de guaraná

Sistema	Fase móvel	Proporção
II	Benzeno-Metanol	1:3
III	Benzeno-Metanol	1:1
IV	Benzeno-Metanol	3:1
V	Benzeno-Metanol	1:3
VI	Benzeno-Clorofórmio	1:1

RESULTADOS

Baseado nos dados da tabela 2 foi verificada a correlação entre os valores obtidos pelo método gravimétrico e pela determinação espectrofotométrica, observando-se uma boa correlação (coeficiente de correlação = 0,75).

TABELA 2

Teores de cafeína obtidos nas amostras pelos métodos gravimétrico e espectrofotométrico

Amostra Nº	Método gravimétrico g/100 g	Método espectrofotométrico g/100 g
1	4,44	2,38
2	4,40	2,26
3	3,96	2,44
4	5,06	2,95
5	4,76	3,25
6	5,82	3,87
7	5,13	3,09
8	5,87	3,50
9	6,98	3,82
10	6,05	4,14
11	6,25	3,25
12	5,69	3,59
13	5,64	3,89
14	7,43	4,00
15	4,52	3,08
16	6,21	3,12
17	2,90	1,37
18	5,28	2,95
19	5,59	1,70
20	2,31	0,97
21	3,43	2,75
22	6,08	2,59
23	7,17	3,07
24	6,60	2,75
25	6,85	3,90
26	5,44	3,33
27	4,47	2,33
28	6,49	3,25
29	4,99	2,78

A fim de se verificar a significância da correlação quanto ao número de amostras estudadas, foi feito o teste t de Student e Fisher, onde se verificou que o valor calculado era bem superior ao valor crítico de tabela, ao nível de significância de 99,5%, confirmando-se assim a existência da correlação entre os valores dos métodos gravimétrico e espectrofotométrico.

A reta de regressão linear está traçada no gráfico na página seguinte.

Da observação do cromatograma obtido no sistema I foi desenvolvida outra série de cinco sistemas cromatográficos utilizando-se diferentes fases móveis, o que permitiu a verificação do comportamento do resíduo em diferentes polaridades. Em todos os sistemas de fases móveis empregados

sempre se obteve uma mancha para o padrão de cafeína com Rf(s), variando de 0,1 a 0,43.

No caso das amostras, entretanto, foram observadas as seguintes manchas:

Sistema I: boa resolução, com manchas em toda a extensão do percurso.

Sistema II e III: mancha única, difusa, sem efetiva separação da cafeína tanto quanto dos demais componentes.

Sistema IV: boa resolução, com separação dos componentes em várias manchas nítidas de Rf(s) superiores ao da cafeína.

Sistema V e VI: boa resolução, com separação dos componentes em várias manchas nítidas de Rf(s) superiores ao da cafeína que apresentou Rf de 0,1.

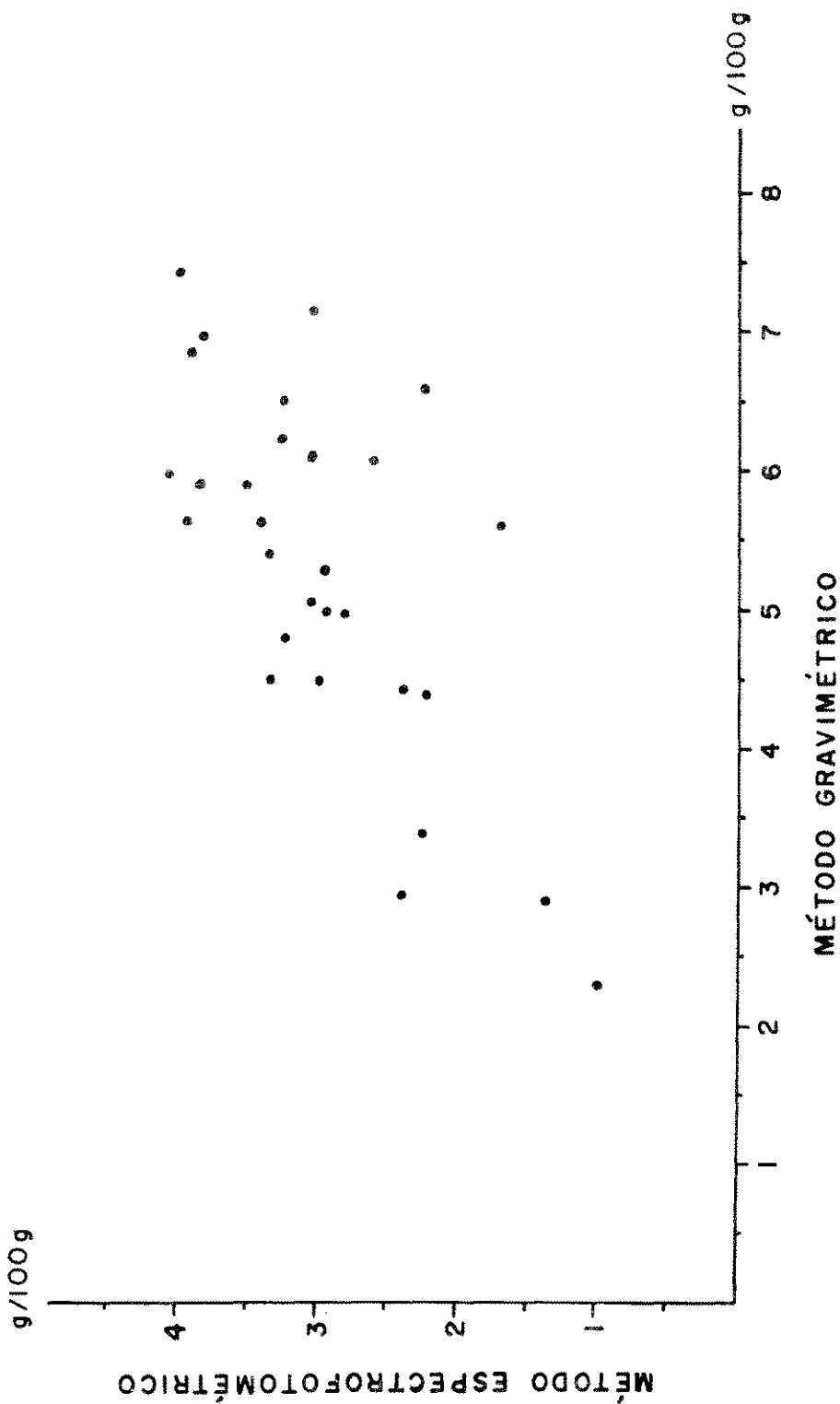


FIGURA — Estudo da correlação entre os valores do teor de cafeína obtidos pelos métodos gravimétrico e espectrofotométrico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A tabela 2 mostra que os resultados obtidos pela determinação espectrofotométrica foram sempre menores que os obtidos pela gravimetria.

Este dado confirma a observação inicial de que os resíduos obtidos não eram homogêneos, constituídos apenas por trimetilxantina (cafeína) e outras xantinas (teobromina e teofilina), mas sim compostos por outras substâncias, extraídas pelo clorofórmio nas condições de análise.

Tendo como preocupação a adequação da amostragem, foi feito um estudo estatístico dos resultados em função do número de amostras ($n = 29$), que revelou a existência da correlação linear-positiva entre os dados da tabela 2, onde o coeficiente de correlação foi de 0,75. O teste t de Student e Fisher indicou que a amostragem foi representativa para a realização do estudo.

Procurou-se mostrar de uma forma simples e rápida, usando a cromatografia em camada delgada, que o resíduo era constituído por uma mistura de substâncias. Esse fato ficou demonstrado já na execução da cromatografia em camada delgada, específica para drogas xantínicas onde, além da mancha característica da cafeína, observaram-se outras manchas em toda extensão do percurso cromatográfico. Com o emprego de solventes apolares como fase móvel, obteve-se melhor resolução das manchas, indicando assim a natureza lipofílica das substâncias presentes no

resíduo, o que concorda com a constatação da não solubilização total do resíduo em ácido clorídrico 0,1 N, quando da diluição para determinação espectrofotométrica.

Sabe-se que os frutos de *Paullinia cupana* Kunth, variedade *sorbilis*, têm como componentes: cafeína, teobromina e teofilina, apesar de alguns autores admitirem a ausência de dimetilxantinas (teobromina e teofilina) nos frutos, encontrando-se apenas cafeína^{5,10,11}. A teobromina apresenta baixa solubilidade em clorofórmio e em água, sendo que seu coeficiente de partição no sistema clorofórmio/água favorece a solubilização parcial¹⁰ na água durante a lavagem do extrato clorofórmico, eliminando em parte a interferência da teobromina no resultado final.

Por outro lado, as bases xantínicas têm um comportamento espectral próximo, apresentando picos de máxima absorção na mesma faixa de comprimento de onda (270 nm-274 nm), o que deveria aumentar a absorção da solução-amostra no ultra-violeta, como resultado da soma das outras metilxantinas presentes. Ainda assim, os resultados obtidos pela determinação espectrofotométrica foram menores que os obtidos pela gravimétrica.

Os resultados obtidos permitem-nos sugerir a introdução da espectrofotometria na determinação da cafeína em guaraná, em complementação à técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira, 3ª edição, 1977.

RIALA6/625

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & HOPPEN, V.R. — Use of the spectrophotometric method in the caffeine determination in guarana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):39-44, 1987.

ABSTRACT: The results of the quantitative determination of caffeine in guarana according to the gravimetric method specified by the 3rd edition of Brazilian Pharmacopeia were compared to the spectrophotometric determination of the residues dissolved in HCL 0.1 N at 273 nm. Substances other than xanthinic compounds in the residue were shown by thin-layer chromatography using different solvent systems. The values obtained by spectrophotometric method were always smaller than those obtained by the gravimetric method.

DESCRIPTORS: guarana (*Paullinia cupana* Kunth), determination of caffeine in; caffeine in guarana, determination; spectrophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLAUCH, J.L. & TARKA, S.M., JR. — HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea, and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.*, **48**:745-50, 1983.
2. CAGNO, N. — Sobre alguns aspectos importantes do guaraná (*Paullinia cupana*). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **42**(1):69-99, 1942.
3. CLARKE, E.G.C., ed. — *Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*. London, Pharmaceutical Press, 1969. p. 234.
4. Ibid. p. 567-8.
5. COSTA, A.F. — *Farmacognosia*. 2ª ed., atualizada. Lisboa, Calouste Gulbenkian [1978]. v. 2, p. 748-9.
6. FARMACOPÉIA brasileira. 3ª ed. São Paulo, Andrei, 1977. p. 829-31.
7. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2ª ed. São Paulo, Siqueira, 1959. p. 512-3.
8. GARRATT, D.C.; BREALEY, L.; JOHNSON, C.A.; SMITH, K.L. & SYKES, G. — *The quantitative analysis of drugs*. 3rd ed. London, Chapman & Hall, 1964. p. 138-43.
9. LEBEAU, P.; JANOT, M.M. et alii — *Traité de pharmacie chimique*. Paris, Masson, 1955-56. Tome 4, p. 3285-324.
10. MARAVALHAS, N. — *Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína*. [Manaus] Inst. Nac. Pesquisa da Amazônia, 1965. p. 5-12. (publ. nº 10 — Química).
11. Ibid. p. 17-23.
12. PHARMACOPÉE française. Paris, L'Adrapharm [1976]. 1ère part. [Kola (*Cola nitida*)].
13. PHARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo, Editora Nacional [1929]. p. 498
14. REID, S.J. & GOOD, T.J. — Use of chromatographic mode sequencing for sample preparation in the analysis of caffeine and theobromine from beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **30**:775-8, 1982.
15. SIMÃO, A.M.; MURADIAN, J. & CARVALHO, J.P.P. — Isolamento do pigmento vermelho natural do pó de guaraná e doseamento de cafeína no extrato clorofórmico. *Rev. Agricult.*, Piracicaba, **59**(2):187-202, 1984.
16. STAHL, E.; DUMONT, E.; JORK, H.; KRAUS, L.; ROZUMEK, H.-E., & SCHORN, P.-J. — *Analyse chromatographique et microscopique des drogues*. Trad. de l'allemand par M. Denayer-Tournay. Paris, Entreprise Moderne d'edition, c1970. p. 219-222.

Recebido para publicação em 29 de abril de 1987.

CHLAMYDIA TRACHOMATIS EM ESFREGAÇOS CERVICAIS E VAGINAIS: IMPORTÂNCIA DO MÉTODO DE PAPANICOLAOU NO RASTREAMENTO EM GRANDES POPULAÇÕES*

Marina Yoshië Sakamoto MAEDA**
Maria José CAVALIERE**
Lai Wun Song SHIH**
Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO**

RIALA6/626

MAEDA, M.Y.S.; CAVALIERE, M.J.; SHIH, L.W.S. & YAMAMOTO, L.S.U. —
Chlamydia trachomatis em esfregaços cervicais e vaginais: importância do método de Papanicolaou no rastreamento em grandes populações. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 45-50, 1987.

RESUMO: Foram selecionados, pelo método de Papanicolaou, esfregaços cervicais e vaginais sugestivos de infecção por *Chlamydia trachomatis*, para confirmação da infecção em colheita subsequente, por um método mais específico como a imunofluorescência, cuja aplicação não é prática em todos os casos, devido ao custo e tempo empregados. Foi utilizada uma amostragem de 40.000 esfregaços cervicais e vaginais que foram corados pelo método de Papanicolaou. Utilizando critérios morfológicos padronizados, foram detectados 97 (0,3%) casos sugestivos de infecção por *C. trachomatis*. Destes, selecionaram-se para repetição de colheita 41 pacientes. Duas lâminas foram preparadas: uma corada pelo método de Papanicolaou e outra submetida à reação de imunofluorescência direta. Dos 41 casos, 27 (66%) foram positivos pela imunofluorescência, sendo que destes 27 casos, 19 permaneceram sugestivos pelo método de Papanicolaou e 8, não. Os restantes 14 casos foram negativos pela imunofluorescência, sendo que 4 permaneceram sugestivos pelo método de Papanicolaou e 10, não. Concluiu-se que os critérios morfológicos identificáveis pelo método de Papanicolaou foram importantes no rastreamento de *C. trachomatis*, permitindo detectar casos que, submetidos à imunofluorescência, mostraram um bom índice (66%) de confirmação.

DESCRIPTORIOS: doenças do colo uterino; *Chlamydia trachomatis*; esfregaços vaginais; muco cervical, citopatologia.

INTRODUÇÃO

Chlamydia trachomatis é um microrganismo intracelular obrigatório que infecta células colunares e metaplásicas da endocervix, causando cervicite mucopurulenta e podendo levar também a endometrite e salpingite. A infecção está frequentemente associada ao contato sexual com homens que apresentam uretrite não gonocócica inespecífica. *C. trachomatis* é também responsável pela conjuntivite de inclusão e pneumonite em recém-nascidos devido à transmissão do microrganismo na passagem pelo canal do parto (JAWETZ et alii⁶, TAYLOR-ROBINSON & THOMAS¹¹).

O ciclo de crescimento de *C. trachomatis* envolve uma fase extracelular, onde o microrganismo, metabolicamente inativo, recebe o nome de corpúsculo elementar. Este, atingindo a superfície da célula hospedeira, é englobado pela mesma por fagocitose, passando à fase intracelular infecciosa, com formação do corpúsculo reticular inicial dentro de um vacúolo. Os corpúsculos reticulares multiplicam-se por fissão binária dentro de um ou vários vacúolos na célula hospedeira. O estágio final é indicado pela presença, na célula hospedeira, de vacúolos perinucleares, com bordos distintos, amoldamento, justaposição e inclusões centrais em alvo (GUPTA et alii⁴). Posteriormente, estas células se rompem e libertam novos corpúsculos elementares.

* Realizado no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

C. trachomatis tem sido apontada como um dos principais agentes responsáveis por infecção cervical em mulheres (BORGES et alii², GUPTA et alii⁴, RASSY⁸, TAYLOR-ROBINSON & THOMAS¹¹); daí o interesse em detectar sua presença em esfregaços cervico-vaginais de mulheres que procuram os Centros de Saúde para prevenção do câncer e tratamento de infecções ginecológicas.

Tem sido demonstrada a relação da infecção por *C. trachomatis* com metaplasia (BORGES et alii²) e com displasia e câncer cervical (HERE et alii³).

O presente trabalho apresenta um método de rastreamento do diagnóstico de *C. trachomatis* em grandes populações. O método consiste em duas etapas:

- a) Seleção de casos sugestivos de infecção por *C. trachomatis* na triagem geral de esfregaços cervico-vaginais corados pelo Papanicolaou, onde se evidenciam vacúolos de inclusão característicos.
- b) Solicitação de uma segunda amostra dos casos selecionados sem tratamento prévio das pacientes, para exame pela imunofluorescência e confirmação do diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento consistiu no estudo de uma amostra de 40.000 esfregaços cervico-vaginais recebidos pelo Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz para exame de prevenção de câncer. Utilizando critérios morfológicos padronizados, segundo GUPTA et alii⁴, para evidenciar de inclusões citoplasmáticas de *C. trachomatis* na coloração de Papanicolaou, foram encontrados 97 casos (0,3%) sugestivos. Destes, selecionaram-se para repetição da colheita, em lâminas duplas, fixadas em álcool-éter ou carbowax, 41 mulheres sem tratamento prévio, idade média de 45 anos, casadas, não gestantes, não fazendo uso de anticoncepcional.

Na segunda amostra, um esfregaço de cada caso foi corado pelo método de Papanicolaou, e analisado segundo critérios morfológicos nos aspectos de: presença de inclusões citoplasmáticas sugestivas de *C. trachomatis*, classificação do diagnóstico citológico, presença de substrato leucocitário, flora associada, presença de metaplasia. Outro esfregaço, após refixação em acetona por quinze minutos, foi submetido a teste de imunofluorescência direta utilizando o *Micro Trak* preparado pelos laboratórios Syva. Delimitou-se com lápis de diamante em cada lâmina uma área

circular de 6 mm de diâmetro contendo material suficiente, nem muito escasso, nem muito espesso. Adicionou-se, após re-hidratação das lâminas, à área delimitada cerca de 10 μ l da solução *Micro Trak* contendo o anticorpo marcado. As lâminas assim preparadas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, a seguir lavadas em água destilada e montadas em lâminulas utilizando solução tamponada de glicerina. Os controles positivo e negativo utilizados foram os fornecidos pelo *Micro Trak*. Os preparados foram examinados em microscópio Zeiss epifluorescente no aumento de 500 vezes (objetiva de imersão). Os casos positivos mostraram a presença de corpúsculos elementares característicos com fluorescência verde-maçã, em forma de disco. Cada lâmina foi examinada por pelo menos duas pessoas diferentes, sendo considerada positiva aquela onde houve concordância de diagnóstico e cada campo continha pelo menos três corpúsculos elementares.

RESULTADOS

A figura 1 mostra o aspecto característico das inclusões citoplasmáticas tal como são vistas na coloração de Papanicolaou. A figura 2 mostra o aspecto dos corpúsculos elementares vistos ao microscópio de fluorescência em esfregaços submetidos ao teste de imunofluorescência direta.

A tabela da página 48 mostra a comparação dos resultados pelo exame de Papanicolaou e pela imunofluorescência. Dos 41 casos estudados, 27 foram positivos pela imunofluorescência e 14 negativos.

Casos positivos pela imunofluorescência: dos 27 casos positivos, 19 eram sugestivos pelo método de Papanicolaou na segunda amostra e 8 não, representando os últimos os falso-negativos.

Casos negativos pela imunofluorescência: dos 14 casos negativos, 4 eram sugestivos pelo método de Papanicolaou, representando os falso-positivos, e 10 não.

Considerando o método de Papanicolaou e a imunofluorescência, aquele mostrou sensibilidade de 83% e especificidade de 55%.

Os aspectos citológicos observados pelo método de Papanicolaou nos 27 casos sugestivos confirmados pela imunofluorescência foram: citologia normal, 1 (4%) e inflamatória 26 casos (96%); substrato polimorfonuclear presente em 23 casos (85%); metaplasia presente em 21 casos (78%); flora bacteriana dos tipos cocóide, 16 (60%), bacilar, 6 (22%) e mista, 2 casos (7%).

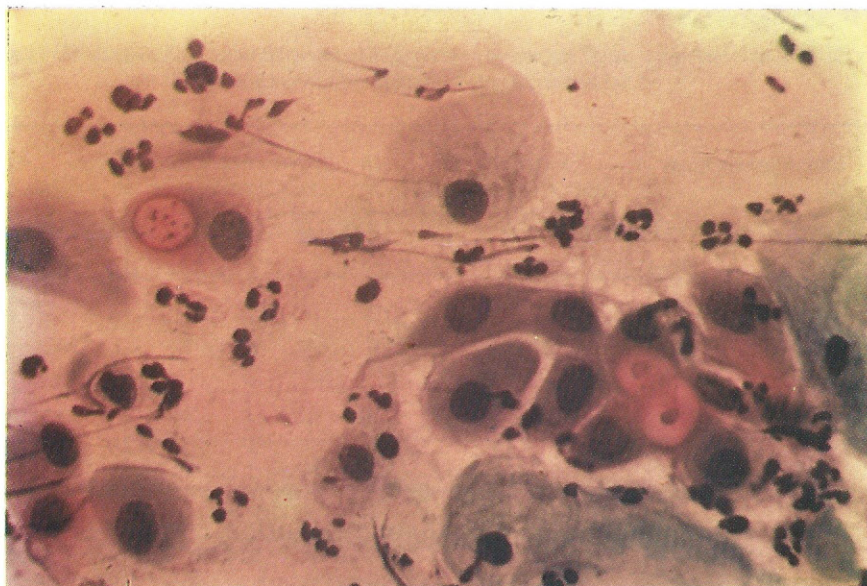


FIGURA 1 — Esfregaço cervical. Célula epitelial parabasal infectada por *Chlamydia trachomatis*. Coloração pelo método de Papanicolaou. 200 x, ampliada.

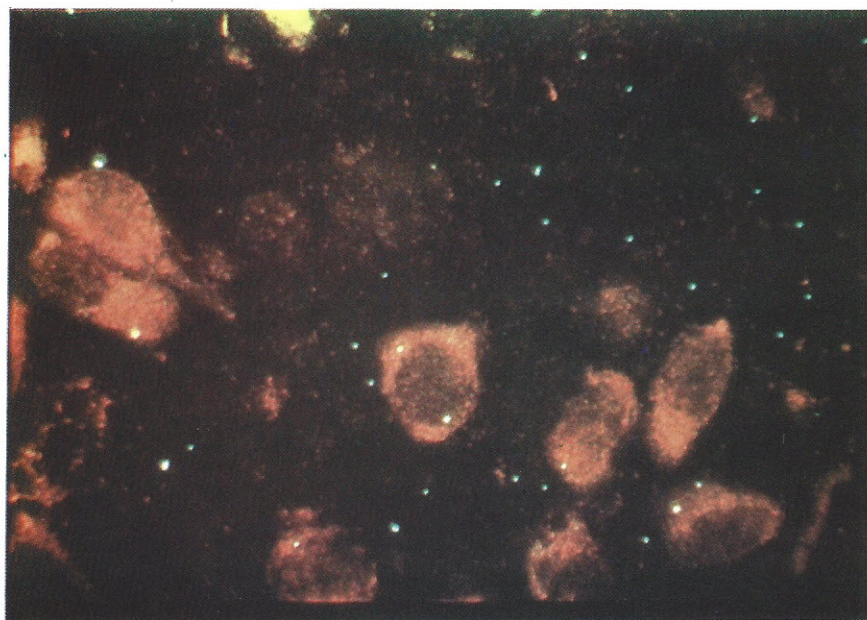


FIGURA 2 — Aspecto dos corpúsculos elementares extracelulares em esfregaços endocervicais submetidos ao teste de imunofluorescência direta (*Micro Trak*). 500 x, ampliada.

TABELA

Resultados obtidos na observação de 41 esfregaços cervicais e vaginais corados pelo método de Papanicolaou e submetidos à reação de imunofluorescência

Método de Papanicolaou \ Imunofluorescência	Casos positivos para <i>C. trachomatis</i>		Casos negativos para <i>C. trachomatis</i>		Total de casos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Casos sugestivos de <i>C. trachomatis</i>	19	46	4	10	23	56
Casos negativos para <i>C. trachomatis</i>	8	20	10	24	18	44
Total	27	66	14	34	41	100

DISCUSSÃO

Vários autores, como GUPTA et alii⁴ e TERHO¹², têm chamado a atenção para a presença de *C. trachomatis* como agente infeccioso de alta incidência, destacando suas manifestações clínicas e citopatológicas. A finalidade do presente trabalho foi demonstrar que o método de Papanicolaou é útil para o rastreamento deste agente em grandes populações com subsequente confirmação pela imunofluorescência direta nos casos sugestivos.

As pacientes por nós analisadas apresentavam em média 45 anos de idade, em contraste com os relatos de GUPTA et alii⁴ em que as pacientes eram mais jovens.

Os nossos achados citológicos são semelhantes aos relatados por BORGES et alii², com relação a exsudato inflamatório, tipos de células parasitadas (principalmente as metaplásicas) e aspectos das inclusões evidenciadas pelo método de Papanicolaou.

Um achado adicional de nosso trabalho foi a associação freqüente de *C. trachomatis* com flora cocóide.

Nosso critério de positividade pela imunofluorescência foi semelhante ao de BELDA et alii¹ e UYEDA et alii¹³, com relação à quantidade de corpúsculos elementares por campo.

O teste de imunofluorescência revelou 66% de positividade no total dos casos suspeitos na primeira colheita.

Quanto à utilidade do teste de imunofluorescência, vários autores (BRENDA et alii³, MUN-

DAY et alii⁷, SHAFER et alii⁹, STAM et alii¹⁰) têm citado sua alta especificidade e sensibilidade com relação à cultura, considerando-o como uma alternativa diagnóstica para detecção de *C. trachomatis* em casos suspeitos.

Os anticorpos monoclonais utilizados neste experimento são altamente específicos para proteína da membrana externa de *C. trachomatis*, embora resultados falso-negativos possam ser obtidos em amostras pouco preservadas, ou falso-positivos pela ligação inespecífica de imunoglobulinas à superfície de bactérias; neste caso, os corpúsculos elementares verdadeiros são distinguíveis pelo tamanho, que é de duas a três vezes menor que o das bactérias.

Quanto ao método de Papanicolaou, este mostrou ser um bom recurso para triagem de casos suspeitos, embora tenhamos encontrado casos falso-positivos, devido provavelmente à presença de vacúolos degenerativos semelhantes aos vacúolos de inclusão de *C. trachomatis*, ou de falso-negativos devido à ausência de células com estes vacúolos na amostra, embora esta possa conter corpúsculos elementares. A imunofluorescência consistiu portanto no método complementar, que permitiu a confirmação ou não da presença do microrganismo.

CONCLUSÃO

O método de Papanicolaou, próprio para detecção de câncer e lesões precursoras, permite além disso detectar agentes etiológicos, inclusive vacúolos com inclusões suspeitas de infecção por *C. trachomatis*, em seus diversos estágios. No entanto, este método não substitui aqueles mais sensíveis para detecção deste microrganismo, como a

imunofluorescência direta. Comparado a este método, o de Papanicolaou revelou uma sensibilidade de 83% e especificidade de 55%.

Concluimos que o método de Papanicolaou, simples e de baixo custo operacional, permite detectar casos suspeitos de *C. trachomatis*. Nestes, as pacientes seriam submetidas a uma segunda co-

lheita, para a realização de um teste mais específico, como a imunofluorescência.

Agradecimentos

À Divisão Diagnóstica do Laboratório Merck, São Paulo, pela execução do diapositivo da figura 2.

RIALA6/626

MAEDA, M.Y.S.; CAVALIERE, M.J.; SHIH, L.W.S. & YAMAMOTO, L.S.U. — *Chlamydia trachomatis* in smears of the cervix uteri and vagina. The importance of Papanicolaou staining in the screening of large population groups. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):45-50, 1987.

ABSTRACT: The Papanicolaou method was used for the selection of smears of the uterine cervix which could be employed for the use of a more specific method such as immunofluorescence which was more expensive and time-consuming than Papanicolaou's method. Using standardized morphologic criteria, 97 (0.3%) smears were selected from a total of 40,000 because they were suggestive of infection by *C. trachomatis*. The 97 smears served for the selection of 41 patients who would be called for further sampling. Two smears were made in each patient: one was stained by Papanicolaou method, the other was subjected to direct immunofluorescence. Of the 41 cases, 27 (66%) were positive by immunofluorescence while 19 were positive by Papanicolaou method and 8 were negative. The remaining 14 cases were negative by immunofluorescence while 10 were also negative by Papanicolaou method and 4 were suggestive of *C. trachomatis* infection. It is inferred that Papanicolaou method is important in the screening for *C. trachomatis* since 66% of the suggestive smears were confirmed by the more specific method (immunofluorescence).

DESCRIPTORS: cervix diseases; *Chlamydia trachomatis*; vaginal smears; cervix mucus, citopathology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELDA, W.; MENDES, C.M.F.; CARVALHO, R.P.S.; SIQUEIRA, L.F.G.; FRANCISCO, W. & SANTOS JR., M.F.Q. — *Chlamydia trachomatis*: estudo comparativo entre o isolamento em cultura de células e o exame direto, no diagnóstico de uretrite masculina. *Rev. paul. Med.*, 103:199-201, 1985.
2. BORGES, R.J.; CARMONA, O.; MACHADO, H. & SPARZA, J. — Chlamydial infection in Papanicolaou stained cervical smears. *Acta Cytol.*, 28:471-6, 1974.
3. BRENDA, T.; EVANS, R.T.; HAWKINS, D.A. & TAYLOR-ROBINSON, D. — Sensitivity of detecting *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in smears by use of a fluorescein labeled monoclonal antibody: comparison with conventional chlamydial isolation. *J. clin. Pathol.*, 37:812-6, 1984.
4. GUPTA, P.K.; LEE, E.F.; EROZAN, Y.S.; FROST, J.K.; GEDDES, S. & DONOVAN, P.A. — Cytologic investigations of Chlamydia infection. *Acta Cytol.* 23:315-20, 1979.
5. HARE, M.J.; TAYLOR-ROBINSON, D. & COOPER, P. — Evidence for an association between *Chlamydia trachomatis* and cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89:489-92, 1982.
6. JAWETZ, E.; MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. — Clamídias. In: *Microbiologia Médica*, 13ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1980. p. 248-55.
7. MUNDAY, P.E.; JOHNSON, A.P.; THOMAS, B.J. & TAYLOR-ROBINSON, D. A comparison of sensitivity of immunofluorescence and Giemsa for staining *Chlamydia trachomatis* inclusions in cycloheximide-treated McCoy cells. *J. clin. Pathol.*, 33:177-9, 1980.
8. RASSY, J.C. — *Chlamydia trachomatis*: microbiologia, implicações clínicas e diagnósticas. *Folha Med.*, 87:163-7, 1983.
9. SHAFER, M.A.; VAUGHAN, E.; LIPKIN, E.S.; MOSCICKI, B.A. & SCHACHTER, J. — Evaluation of fluorescein-conjugated monoclonal antibody test to detect *Chlamydia trachomatis* endocervical infections in adolescent girls. *J. Pediatr.*, 5:779-83, 1986.

MAEDA, M.Y.S.; CAVALIERE, M.J.; SHIH, L.W.S. & YAMAMOTO, L.S.U. — *Chlamydia trachomatis* em esfregaços cervicais e vaginais: importância do método de Papanicolaou no rastreamento em grandes populações. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):45-50, 1987.

10. STAM, W.E.; HARRISON, R.H.; ALEXANDER, E.; CLES, L.D.; SPENCER, M., & QUINN, T.C. — Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by direct immunofluorescence staining of genital secretions. *Ann. intern. Med.*, 101:638-41, 1984.
11. TAYLOR-ROBINSON, D. & THOMAS, B.J. — The role of *Chlamydia trachomatis* in genital-tract and associated diseases. *J. clin. Pathol.*, 33:205-33, 1980.
12. TERHO, P. — *Chlamydia trachomatis* and clinical genital infections: a general review. *Infection*, 10(suppl.1):55-9, 1982.
13. UYEDA, C.T.; WELBORN, N.; ELLISON-BIRANG, N. SHUNK, K. & TSAOUSE, B. — Rapid diagnosis of Chlamydial infections with the Micro Trak direct test. *J. clin. Biol.*, 20:948-50, 1984.

Recebido para publicação em 11 de maio de 1987.

CULTURAS CELULARES NA DETECÇÃO DA TOXICIDADE DE MATERIAIS MÉDICO-HOSPITALARES E OUTROS QUE ENTRAM EM CONTATO COM O SER HUMANO*

Áurea Silveira CRUZ**
Kátia Moreira CUPPOLONI**
Clélia H.O. MARTINEZ**
Luis F. Salles GOMES**

RIALA6/627

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O. & GOMES, L.F.S. — Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 51-57, 1987.

RESUMO: Em testes de citotoxicidade *in vitro*, pelo método de difusão em ágar, para materiais de uso médico hospitalar e outros, foram usadas seis linhagens celulares estabelecidas: AV₃, Vero, RC-IAL, NCTC clone 929, RV-IAL, HeLa e cultura primária de embrião de galinha (EG). Nos 20 materiais testados, as células EG demonstraram maior sensibilidade, seguidas das células RC-IAL e HeLa. O efeito citotóxico foi avaliado pela presença e pelas medidas dos diâmetro dos halos difundidos. Devido às dificuldades operacionais com a cultura primária EG recomenda-se, para os testes de citotoxicidade *in vitro* dos materiais citados, o uso de placas, em duplicata, das células RC-IAL e HeLa.

DESCRIPTORIOS: culturas celulares; materiais biocompatíveis; testes de toxicidade.

INTRODUÇÃO

As culturas celulares vêm apresentando crescente importância nos testes para detectar a toxicidade de materiais de uso médico-hospitalar. Alguns destes materiais, tais como: tubos intravenosos, catéteres, sondas, válvulas, drenos, fraldas, óleos, loções etc., entram em contato direto com o ser humano, enquanto outros o fazem indiretamente como os tubos de bomba peristáltica, componentes de diálise, ressuscitadores, bolsas, copos, frascos, seringas etc.

Numerosos trabalhos publicados indicam, ora maior sensibilidade de animais em relação às culturas celulares^{11,12}, ora maior sensibilidade das culturas celulares em relação a estes animais, o que torna o uso destas últimas mais vantajoso por apresentar reprodutibilidade, rapidez e menor custo na análise^{3,11,14,16,17,18,20,21}.

Existem várias técnicas para o teste de toxicidade em culturas celulares. Em algumas, utiliza-se a

semeadura das células após contato do meio de cultura com o material a ser testado¹⁵; em outras, extrai-se a parte tóxica dos materiais¹⁸, embebendo-a em papéis de filtro⁴. Em algumas técnicas, ainda, o material a ser testado é diretamente depositado sobre as culturas celulares^{3,7, 18}, enquanto que, em outras, o material a ser testado é depositado sobre uma camada de ágar sobreposta às culturas celulares. A inibição metabólica das culturas celulares também é utilizada como método para detectar citotoxicidade de materiais de uso médico^{20,21}.

Os métodos que utilizam camada de ágar sobre as culturas celulares de diferentes origens, e avaliam o halo citotóxico difundido, têm sido dos mais usados devido às vantagens práticas. Nada encontramos, na literatura nacional, sobre testes de toxicidade de materiais de uso médico-hospitalar em culturas celulares nos quais se utiliza camada de ágar, com exceção de extensa tese de mestrado e sua posterior publicação em parte^{12,13} sobre testes de biocompatibilidade de produtos mé-

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

dico-hospitalares *in vivo* e *in vitro*, onde foi empregada somente uma linhagem celular.

Em nosso trabalho, apresentamos a metodologia para os testes de citotoxicidade *in vitro* pelo método da difusão em ágar e, através desta, comparamos seis diferentes linhagens de culturas celulares e uma cultura primária para avaliação da sensibilidade destas células frente aos diferentes materiais de uso médico-hospitalar, e outros que entram em contato com o ser humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Dos materiais processados no período de junho de 1983 a setembro de 1985, elegemos, por sorteio, 20 amostras para serem trabalhadas, todas provenientes de Indústrias do país, que solicitaram a realização da prova de citotoxicidade *in vitro*.

A caracterização destas amostras foi estabelecida de acordo com a especificação da indústria. As amostras examinadas tinham a seguinte natureza: as de números 17, 18, 19, 20, 66, 77, 78 e 79 eram placas e/ou tecidos de látex; as de n.º 86 e 87 eram amostras de fibras de raioim; as de n.º 7, 8, 9, 172 e 173 eram cerdas e/ou tecidos de náilon; as de n.º 152 e 153 eram grânulos, tubos e anéis de cloreto de polivinila (PVC); as de n.º 127 e 200 eram tiras e placas de silicone e, finalmente, a de n.º 199 era lâmina de poliuretano.

As amostras não foram submetidas a qualquer tratamento prévio, como esterilização, extração e outros procedimentos. Para a utilização do teste, as amostras foram cortadas de forma quadrada com 5 mm de lado.

Em todos os testes, foram utilizados como controles fragmentos de látex tóxico e papéis de filtro atóxico. A análise de cada amostra foi feita separadamente em placa de Petri, em duplicata.

Culturas Celulares

Seis linhagens celulares foram utilizadas, sendo que quatro eram linhagens certificadas, provenientes do "American Type Culture Collection" (ATCC) e duas eram linhagem celulares isoladas e caracterizadas na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, denominadas RC-IAL, rim de coelho e RV-IAL, rim de vitelo⁵.

As quatro linhagens provenientes do ATCC foram: NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), tecido conectivo de camundongo; células HeLa

(ATCC-CCL 2), carcinoma epitelóide de cervix humana; células Vero (ATCC-CCL 81), rim de macaco verde africano, e células AV₃ (ATCC-CCL 21), âmnio humano.

Foram também utilizadas culturas primárias de células de embrião de galinha (EG) que foram feitas a partir de ovos embrionados de 9 dias, pelo método de Youngner⁹.

Todas as linhagens celulares durante a execução do trabalho foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MME) com 10% de soro de vitelo inativado (SV), sem antibiótico, e incubadas a 36°C. Para a dispersão do tapete celular, foi utilizada uma associação de tripsina a 0,20% e verse-ne a 0,02%⁹.

Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi composto de partes iguais de meio de Eagle, duas vezes concentrado, mais 10% de soro de vitelo e ágar (Bacto-Difco) a 1,8%, contendo 0,01% de vermelho neutro como corante vital. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção, com o meio mínimo de Eagle, duas vezes concentrado, mais 10% de SV, ambos a uma temperatura de 44°C, e aplicado sobre a camada de células previamente crescidas nas placas de Petri.

Método

O método utilizado para análise de citotoxicidade *in vitro* foi o da difusão em camada de ágar *overlay* sobre monocamadas de cultura celular.

As células foram semeadas em placas de Petri de vidro neutro de 50 mm de diâmetro, na concentração de $1,5 \times 10^5$ cel/ml de MME com 10% de SV, sem antibiótico, no volume de 6,0 ml e incubadas por 48 horas, a 37°C, em estufa com ambiente de CO₂, a 5%. Em seguida, este meio de crescimento foi substituído pelo meio *overlay* e colocado sobre o tapete celular no volume constante de 5,0ml. Antes que esta camada de ágar solidificasse completamente, as amostras eram colocadas no centro da placa de Petri e mantidas no escuro por 30 minutos para evitar ação fototóxica do corante, tempo necessário para o total endurecimento do meio *overlay*. As placas eram incubadas novamente na posição invertida em ambiente de 5% de CO₂, por 24 horas, a 37°C. As leituras dos resultados nas placas foram feitas: macroscopicamente, onde a presença de citotoxicidade era constatada por halo claro, ao redor do material tóxico, correspondente às células mortas e, microscopicamente, para verificação de alterações morfológicas circundando a amostra. Quando presente, o diâmetro dos halos resultantes do efei-

to tóxico sobre a células era cuidadosamente medido, usando régua milimetrada. Consideramos como negativas as placas sem presença de halo ao redor do material e também aquelas em que foram observadas somente alterações morfológicas celulares sob o material testado.

Em todos os testes foram incluídos um material conhecidamente positivo e outro negativo.

A leitura das placas e a avaliação do comprimento do diâmetro foram sempre efetuadas por dois dos autores.

RESULTADOS

Das vinte amostras estudadas, oito apresentaram efeito citotóxico para algumas linhagens celulares utilizadas e para a cultura primária de embrião de galinha (EG). Este efeito consistia na formação de halo incolor ao redor da amostra, correspondente às células mortas não impregnadas pelo corante vital (vermelho neutro) incorporado ao *overlay* (figura da página seguinte).

Verificou-se, nestes experimentos, que a difusão do efeito tóxico sobre as células foi, sob o ponto de vista macroscópico, homogênea e circular, facilitando a visualização e avaliação dos halos formados. Ainda, a modulação na forma quadrada e dimensões praticamente constante que demos aos materiais examinados favoreceram a leitura dos resultados.

As amostras n° 7, 8, 9, 18, 19, 66, 86, 87, 152, 153, 172 e 173 foram rotuladas como negativas ao teste, isto é, não apresentaram qualquer halo ou alterações celulares circundando a amostra em todas as culturas de células utilizadas (tabela 1). As amostras n° 17, 20, 77, 78, 79, 127, 199 e 200 foram qualitativamente positivas, isto é, revelaram a presença de halo correspondente à difusão do efeito tóxico sobre as monocamadas das células em experimento, com evidências microscópicas de alterações e lise celular (tabela 1).

Em relação à sensibilidade de cada sistema celular usado, nossos resultados permitem qualitati-

TABELA 1

Resultado dos testes de toxicidade realizados em sete amostras positivas frente aos diferentes sistemas celulares

Material testado	Amostra n°	Diâmetro (em mm) dos halos nas duas placas com culturas celulares						
		HeLa	RC-IAL	NCTC clone 929	Vero	RV-IAL	E.G.	AV ₃
Placas e/ou tecido de látex	17	17 13	17 15	17 13	15 13	13 13	21 25	11 13
	20	11 11	13 15	15 15	11 15	9 11	25 21	11 9
	77	9 7	15 13	13 0	0 7	7 7	17 17	0 11
	78	11 9	31 35	15 0	0 0	0 0	15 13	0 13
	79	11 13	31 31	13 15	0 6	15 11	15 23	9 9
Tiras ou placas de silicone	127	13 13	13 11	0 15	15 0	0 0	15 15	0 0
	200	29 23	19 17	17 17	15 17	13 13	17 21	11 13
Látex	Controle positivo	19	25	23	15	23	45	15
Papel de filtro	Controle negativo	0	0	0	0	0	0	0

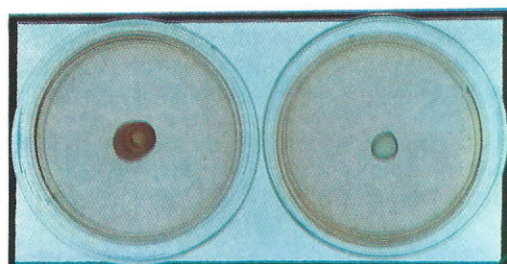


FIGURA — Halo observado em células RC-IAL na presença de material tóxico (a); ausência de halo nas células RC-IAL na presença de material tóxico (b).

vamente afastar as linhagens Vero, RV-IAL e AV₃, como as menos sensíveis, porque não exibiram difusão do fator citotóxico frente aos materiais n° 78 e 127. Ainda, sob este critério qualitativo, as linhagens AV₃, Vero e NCTC clone 929 responderam diferentemente nas duas placas utilizadas frente aos materiais n° 77, 78, e 127 (NCTC clone 929), 77, 79, e 127 (Vero) e 77, 78, 199 (AV₃).

Podemos inferir, por simples apreciação, que estas linhagens celulares demonstraram menor sensibilidade aos materiais testados quando comparadas as outras linhagens em experimento.

Nas oito amostras positivas, os comprimentos dos diâmetro dos halos apresentaram variações apreciáveis segundo o tipo de célula usada.

Pela impossibilidade de calcularmos a medida das amostras, é óbvio que pequenas variações, avaliadas em 2-6 mm (média de 4 mm) de diâmetro de difusão do fator citotóxico, corram por conta destas imperfeições.

Relacionando as medidas dos halos, as células que mostraram maior sensibilidade ao efeito tóxico foram as células primárias de embrião de galinha (EG) e as linhagens celulares RC-IAL e HeLa. Isto porque, nas oito amostras que resultaram positivas, tivemos cinco vezes a presença de maior halo de citotoxicidade, quando os materiais n° 17, 20, 77, 127 e 199 foram testados na cultura primária de E.G. (tabela 1 e 2). Por duas vezes (amostras n° 78 e 79) tivemos maior halo de citotoxicidade apresentado na linhagem RC-IAL e, por uma vez (amostra n° 200) na linhagem celular HeLa (tabelas 1 e 2).

As linhagens que apresentaram resultados mais homogêneos e comparáveis frente aos variados

TABELA 2

Resultado dos testes de citotoxicidade das oito amostras positivas

Material testado	Amostra n°	Média dos diâmetros (em mm) dos halos de citotoxicidade nas diferentes culturas celulares						
		HeLa	RC-IAL	NCTC clone 929	Vero	RV-IAL	E.G.	AV ₃
Placas e/ou tecidos de látex	17	15,0	16,0	15,0	14,0	13,0	23,0	12,0
	20	11,0	14,0	15,0	13,0	10,0	23,0	10,0
	77	8,0	14,0	6,5	3,5	7,0	17,0	5,5
	78	10,0	33,0	7,5	0,0	0,0	14,0	6,5
	79	12,0	31,0	14,0	3,0	13,0	19,0	9,0
Tiras e/ou placas de silicone	127	13,0	12,0	7,5	7,5	0,0	15,0	0,0
	200	26,0	18,0	17,0	16,0	13,0	19,0	12,0
Lâminas de poliuretano	199	18,0	16,0	14,0	15,0	11,0	20,0	6,5
Média geral	—	14,1	19,2	12,1	9,0	8,4	18,7	7,7

materiais foram as células E.G., RC-IAL e HeLa (tabelas 1 e 2).

Se considerarmos a média dos diâmetros dos halos exibidos nas diferentes células, verificamos que os sistemas celulares RC-IAL, E.G. e HeLa foram os que apresentaram as maiores médias decorrentes da maior sensibilidade destas células (tabela 2). Exceções foram as variações em milímetros verificadas nas amostras n.º 199 (poliuretano) e 78 (látex) que apresentaram diferenças de 13 mm quando foi empregada a linhagem celular AV₃, 15 mm quando as amostras n.º 78 e 127 foram testadas frentes à linhagem celular NCTC clone 929, e 15 mm quando as amostras n.º 77 e 127 foram testadas frente à linhagem Vero, ocorrendo justamente nas placas em que o mesmo material foi positivo em uma placa e negativo em outra (tabela 1).

O material controle positivo também apresentou maior halo de citotoxicidade frente à cultura celular primária E.G., seguida pela RC-IAL. O controle negativo não deu halo em qualquer cultura celular usada.

DISCUSSÃO

Apesar de não haver metodologia oficial no Brasil, nos últimos anos tem havido interesse das indústrias paulistas em analisar, como controle de qualidade, a toxicidade das suas matérias primas e produtos finais que entram em contato com o ser humano. Importantes subsídios para o aspecto legal deste problema foram apresentados por PINTO & SAITO¹³.

Os testes de toxicidade *in vivo* demonstram série de desvantagens, pois os animais mais utilizados (coelhos, camundongos, *hamsters* etc.) apresentam fatores de variação, tais como, idade, sexo, nutrição, predisposição genética (mesmo temporária) que acarretam diferenças qualitativas nos testes frente aos produtos tóxicos. Ainda, o tempo gasto para estes testes é bem mais longo e mais oneroso, e o uso dos animais é criticado e combatido pela Sociedade Protetora dos Animais.

Confrontando as condições técnicas dos ensaios *in vivo* e *in vitro*^{14,21}, não há dúvida de que este último é mais simples e de melhor reprodutibilidade, pois trabalha em condições mais fixas, possibilitando resultados em menor espaço de tempo e com maior sensibilidade^{3,11,16,18,21}.

Há divergências entre autores quanto aos resultados dos testes *in vitro* com culturas celulares. Assim, o método do contato direto da amostra

sobre as células foi o de maior sensibilidade, quando comparado ao método de extração do produto tóxico⁷; porém, apresenta dificuldades técnicas como a flutuação, no meio de cultura, dos materiais de menor densidade, prejudicando o resultado final¹⁸. Também, neste método, há necessidade imperiosa de esterilização do material antes do teste.

O método da difusão em camada de ágar exhibe as seguintes vantagens: a) não há necessidade de extração do fator tóxico da amostra; b) possibilita a fixação da amostra; c) o ágar protege as células contra agressões mecânicas da amostra; d) facilita a leitura da resposta citotóxica, que é evidenciada pelo halo claro em 24 horas ou menos^{4,8}; e) é praticamente tão sensível quanto o método do contato direto, principalmente após a redução do volume da camada de ágar⁸; f) não há necessidade de esterilização prévia do material. Por estas razões e pelo fato de dispormos de numerosas linhagens celulares de várias origens é que escolhemos este método para a realização das análises de citotoxicidade da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

Pela ótima sensibilidade, muitos autores recomendam o uso das células NCTC-clone 929, quando comparadas às outras linhagens celulares^{8,14,16}. Outros autores afirmam que a cultura primária de embrião de galinha foi a cultura mais sensível¹⁸.

Esse nosso trabalho, a linhagem celular NCTC-929 não se mostrou tão sensível. Entretanto, esta célula é de fácil manuseio e visualização da toxicidade devido a sua morfologia e tamanho. Verificou-se, também, que a linhagem primária EG foi a mais sensível, secundada pelas linhagens RC-IAL e HeLa. Por questão de facilidade operacional, a RC-IAL e a HeLa são as células mais indicadas para a execução dos futuros testes. Com efeito, são linhagens estabelecidas e a cultura de embrião de galinha, além das razões citadas, depende da disponibilidade e da idade dos ovos embrionados. Não temos notícia através da literatura nacional e internacional de que outro autor tenha utilizado células de rim de coelho e de vitelo para testes de citotoxicidade *in vitro* para materiais de uso médico-hospitalar.

A questão da escolha de células com maior sensibilidade é de extrema importância, principalmente quando se analisam produtos com níveis tóxicos baixos. Estes produtos poderiam não afetar pessoas com respostas considerada normal mas, para outras com deficiência em sua resposta imunológica, poderiam acarretar problemas mais sérios.

Não consideramos como positivos os testes em que as culturas mostraram discretas alterações celulares visualizadas através do exame microscópico.

Outro fato que merece comentário é: porque não escolher células de origem humana, como indicador do teste, se os materiais a serem testados terão contato direto ou indireto com o ser humano?

Em nosso trabalho, incluímos duas linhagens de origem humana, as células HeLa e AV₃. Alguns autores preconizam o uso de células humanas diplóides por se mostrarem mais sensíveis^{3,7,16}; entretanto, há dificuldade de se manterem estas células, e sua duração e sensibilidade geralmente são variáveis após a 20ª passagem seriala.

Em relação ao resultado esperado, isto é, o mesmo material que foi positivo em uma placa era negativo em outra, não encontramos qualquer explicação para isso porque as placas foram adquiridas do mesmo fabricante, a altura do *overlay* não excedeu a 5mm, a colocação do material sólido foi delicada, com discreta pressão para fixá-lo no ágar. O aspecto da cultura celular era sempre examinado antes do teste para seleção das placas que apresentassem ótimo crescimento e aspecto microscópico.

Embora a prova de citotoxicidade em culturas celulares seja a mais sensível, é sabido que a resposta aos materiais a serem testados pode, even-

tualmente, variar frente à mesma linhagem celular ou frente às células provenientes do mesmo frasco ou garrafa¹¹.

Por estas razões, consideramos que as provas deverão ser efetuadas sempre em duplicata ou triplicata, em placas diferentes da mesma linhagem celular. As possibilidades de respostas mais condizentes com a realidade serão maiores. Obviamente, se as provas solicitadas forem efetuadas em dois sistemas celulares, a acuidade dos resultados e a sensibilidade do método será melhorada.

Em nosso trabalho, foram fixadas algumas variáveis como, o tempo de leitura, a dimensão do material sólido e a sensibilidade através da formação ou não de halo, e o comprimento do diâmetro como sugerido por outros autores^{4,8,14,18}.

O objetivo final das provas de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* seria estabelecer a correlação entre os resultados destas provas e a resposta no ser humano. Esta resposta carece de qualquer confirmação^{6,10,22}, ainda que a correlação entre DL₅₀ em animais e TL₅₀ em culturas tenha sido descrita²⁰.

Com relação a este trabalho, os objetivos foram atingidos: podemos selecionar, entre outras linhagens, as células RC-IAL e HeLa por serem as mais sensíveis; o Instituto Adolfo Lutz dispõe agora de mais um método para avaliação da toxicidade de materiais que entram em contato com o ser humano e a Indústria, através deste teste, poderá melhorar a qualidade de seus produtos.

RIALA6/627

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O. & GOMES, L.F.S. — Cell culture for detecting toxicity of biocompatible materials. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):51-57, 1987.

ABSTRACT: In vitro citotoxic test using agar diffusion method was performed in medical practice, hospitalar and others materials. The test was carried out in six cell lines and one primary culture of chick embryo cells. In 20 tested materials the chick embryo cells showed best sensibility following by RC-IAL (rabbit kidney) and HeLa cell lines. The citotoxic effect was evaluated by presence and size of diameters of diffused halos compared with controls. Because of operational difficulties in handling primary cultures we suggest that the use of citotoxic method assaying these materials will be done in duplicate plates with RC-IAL and/or HeLa cell lines.

DESCRIPTORS: cells, cultured; biocompatible materials; test for toxicity.

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O. & GOMES, L.F.S. — Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):51-57, 1987.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION — *Catalogue of cell lines & hybridomas*. 5th ed. Rockville, Md., ATCC, 1985. 305 p.
2. BALLS, M. & CLOTHIER, R. — Differentiated cell and organ culture in toxicity testing. *Acta pharmacol. toxicol.*, 52(2):115-37, 1983.
3. BANDO, B.M. & ROSEMBAUM, M.J. — Toxicity in HeLa cells mediated by plastic wraps. *Lab. Pract.*, 22:26-31, 1973.
4. CHABBERT, Y.A. & VIAL, H. — Étude des substances toxiques pour les cultures de tissus en couche monocellulaire par une méthode de diffusion en gélose. *Exp. Cell Res.*, 22:264-274, 1961.
5. CRUZ, A.S.; SAKUMA, M.E. & MARTINEZ, C.H. — RV-IAL. Nova linhagem celular de rim de vitelo. Características e susceptibilidade a alguns vírus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1): 55-59, 1984.
6. EKWALL, B. — Screening of toxic compounds in tissue culture. *Toxicology*, 17: 127-142, 1980.
7. GILL, M. — Direct cell contact screening for materials and devices. *Med. Device Diagn. Ind.*, 4(3):72-6, 1982.
8. GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHMIDT, B. & AUTIAN, J. — Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, 54: 1545-7, 1965.
9. LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J., ed. — *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, D.C., APHA, 1979. 1138p.
10. NARDONE, R.M. — The LD₅₀ test and "in vitro" toxicology strategies. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 52(2):65-79, 1983.
11. NARDONE, R.M. — The interface of toxicology and tissue culture and reflections on the carnation test. *Toxicology*, 17:105-11, 1980.
12. PINTO, T.J.A. — Controle de qualidade de produtos médico-hospitalares. I — Característica de biocompatibilidade de materiais polimérico. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 21(1): 41-61, 1985.
13. PINTO, T.J.A. & SAITO, T. — Controle de qualidade de produtos médico-hospitalares: aspecto legal. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 21(2):188-98, 1985.
14. ROSENBLUTH, S.A.; WEDDINGTON, G.R.; GUESS, W.L. & AUTIAN, J. — Tissue culture method for screening toxicity on plastic materials to be used in medical practices. *J. Pharm. Sci.*, 54:156-9, 1965.
15. STAREK, M. & JANDEJSEK, J. — Standardization of test for toxicity for some materials used in tissue cultures laboratory. *Progr. Immunobiol. Stand.*, 4:450-2, 1970.
16. STAMMATI, A.P.; SILANO, V. & ZUCCO, F. — Toxicology investigations with cell culture systems. *Toxicology*, 20:91-153, 1981.
17. TAKAHASHI, N. — Citotoxicity of mercurial preservatives in cell culture. *Ophthalmic Res.*, 14:63-69, 1982.
18. VASINGTON, P.J.; PIERSMA, H.D.; CORBETT, J.J. & BITTLE, J.L. — Cytotoxicity of rubber closures in tissue culture systems. *J. Pharm. Sci.*, 56:1276-79, 1967.
19. WALUM, E. & PETERSON, A. — Acute toxicity testing in culture of mouse neuroblastoma cells. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 52(2): 100-14, 1983.
20. WENZEL, D.G. & COSMA, G.N. — A quantitative metabolic inhibition test for screening toxic compounds with culture cells. *Toxicology*, 29:173-82, 1983.
21. WILLIAMS, G.M.; DUNKEL, V.C. & RAY, V.A. — Cellular systems for toxicity testing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 407:1-484, 1983.
22. ZUCCO, F. — Introduction to the workshop on the application of tissue culture in toxicology. *Toxicology*, 17:101-4, 1980.

Recebido para publicação em 24 de junho de 1987.

ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE DA *BIOMPHALARIA STRAMINEA* (DUNKER, 1848) DE TAUBATÉ, S.P., À INFECÇÃO POR CEPA S.J. DE *SCHISTOSOMA MANSONI* DO VALE DO PARAÍBA, S.P.*

Luíz dos SANTOS**
Gisela R.A.M. MARQUES***
Ioli B. COSTA**
Cristiano C.A. MARQUES***
Maristela R.O.M. GOMES**

RIALA6/628

SANTOS, L.; MARQUES, G.R.A.M.; COSTA, I.B.; MARQUES, C.C.A.; GOMES, M.R.O.M. — Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) de Taubaté, S.P., à infecção por cepa S.J. de *Schistosoma mansoni* do Vale do Paraíba, S.P.. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):59-63, 1987.

RESUMO: Estudou-se a suscetibilidade de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), originária do município de Taubaté, S.P., comparativamente com *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), à infecção pela cepa S.J. de *Schistosoma mansoni* de São José dos Campos (Vale do Paraíba, S.P.). Pretendeu-se determinar o potencial epidemiológico destas espécies como hospedeiros intermediários de *S. mansoni* frente a cepa valeparaibana. Foram inoculados individualmente 250 *B. straminea* e 250 *B. tenagophila* e mais o grupo controle. Tais moluscos ficaram sob observação durante 60 dias. Foram depois esmagados para detectar presença de esporocistos nos órgãos internos. Ao término do experimento *B. straminea* não se mostrou suscetível à infecção pela cepa S.J. e *B. tenagophila* apresentou 82,2; 86,6 e 83,2% de infecção nos três lotes.

DESCRIPTORIOS: esquistossomose mansônica; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria straminea*; *Biomphalaria tenagophila*.

INTRODUÇÃO

B. straminea apresenta ampla distribuição geográfica sendo assinalada em vários Estados brasileiros. É reconhecidamente um hospedeiro do *S. mansoni* no Nordeste do Brasil, estando intimamente relacionada a altas taxas de esquistossomose humana^{1,2,3}.

Foi detectado em 1985 um criadouro com a presença dessa espécie no município de Taubaté, SP. A predominância de *B. tenagophila* e sua importância epidemiológica na região têm levado a segundo plano o estudo de outras espécies do mesmo gênero como possíveis hospedeiros do *S. mansoni*.

A importância epidemiológica da *B. straminea* no Nordeste brasileiro é bem conhecida, levando, assim, os autores a verificarem a importância do encontro desta espécie na região.

No presente trabalho são apresentados os resultados obtidos com a infecção experimental da *B. straminea* e *B. tenagophila* comparativamente, procedente de Taubaté SP, pela cepa S.J. de *S. mansoni* do Vale do Paraíba.

O objetivo deste experimento foi determinar a potencialidade desse planorbídeo como possível hospedeiro intermediário em área endêmica de esquistossomose mansônica, como o Vale do Paraíba, onde 64,4%¹³ dos casos detectados são autóct-

* Realizado no Laboratório I, Taubaté, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP., e na Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) SR-3, Taubaté, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Da SUCEN.

tones, ressaltando que em 1980 foi encontrado um exemplar naturalmente infectado no município de Cruzeiro, SP¹², fato este não mais ocorrido até o momento, dada a ausência de casos autóctones nas áreas de *B. straminea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos preliminares constaram de coleta de caramujos e exame dos mesmos para verificar se estavam contaminados ou não. Assim, efetuou-se uma coleta de caramujos *B. straminea* no criadouro recentemente descoberto (Sítio Régis Guisard) em Taubaté.

Os exemplares de *B. tenagophila* foram colhidos no Bairro Itapecerica, em Taubaté, em um criadouro já conhecido há vários anos.

Todos os planorbídeos coletados foram examinados e revelaram-se negativos para cercárias de *S. mansoni*.

Suas posturas foram separadas e depostas em aquários com água desclorada, mantida em temperatura constante, com arejamento por borbulhamento. A alimentação dos caramujos constou de folhas de alface fresca e da ração preconizada por OLIVEIRA et alii¹⁰.

Para as inoculações, foram utilizados caramujos com 5 mm de diâmetro de concha. Foram usados 3 lotes nas inoculações e 1 lote controle, para cada uma das espécies estudadas, ou seja: 3 lotes de exemplares *B. straminea* e 3 lotes de *B. tenagophila*, cada um deles com 100, 100 e 50 exemplares, os quais foram inoculados individualmente e respectivamente 5, 10 e 20 miracídeos para cada caramujo. Dois aquários, sendo um com 100 exemplares de *B. straminea* e outro com 100 exemplares de *B. tenagophila*, foram deixados para controle.

As inoculações foram feitas com miracídeos obtidos de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de camundongos contaminados com a cepa S.J de *Schistosoma mansoni*.

Com a matéria fecal de 20 animais foram preparados 6 copos de sedimentação (Hoffman), usando-se água filtrada.

Após 15 a 20 minutos, o sedimento foi colhido e gotejado em placas de Petri com água desclorada, as quais eram colocadas sob uma lâmpada de 60 watts. Alguns minutos após já se observava a saída dos miracídeos que eram coletados com pipeta Pasteur e colocados em uma placa de Petri junto com o caramujo a ser inoculado.

Após 24 horas, os caramujos inoculados eram colocados em aquários, antecipadamente preparados.

Todos os aquários foram observados diariamente para a retirada dos planorbídeos mortos, anotações da temperatura e determinação do pH. Vinte dias após a inoculação, os planorbídeos foram colocados individualmente em frascos de Borel com 80 ml de água desclorada e um pequeno ramo de *Anacharis sp.* como planta arejadora. As observações eram diárias, sendo feitas pela manhã e à tarde.

Após 60 dias, todos os caramujos sobreviventes foram submetidos ao processo de esmagamento, a fim de surpreender um possível retardamento na maturação das cercárias, através da observação de suas formas jovens, os esporocistos, os quais não são eliminados espontaneamente.

RESULTADOS

A análise da tabela da página 62 mostra que *B. straminea* não se mostrou sensível à infecção, pois nenhum molusco dos três lotes inoculados com 5, 10, e 20 miracídeos eliminou cercárias durante os 60 dias de observação que se seguiram à inoculação. Após esse período, os moluscos sobreviventes foram esmagados, não havendo sido detectada nenhuma forma evolutiva de *S. mansoni*.

O mesmo não ocorreu com *B. tenagophila*, que apresentou altas taxas de infecção nos três lotes inoculados, ou seja, 82,2% para o grupo de caramujos inoculados com 5 miracídeos por molusco, 86,3% para o lote inoculado com 10 miracídeos e 83,3% para os que receberam 20 miracídeos cada.

Não foi possível observar qualquer correlação entre a carga parasitária e a taxa de mortalidade (observar tabela). No entanto, foi possível verificar que *B. straminea* adaptou-se melhor às condições em laboratório que *B. tenagophila*.

Os caramujos mortos no decorrer do experimento foram examinados e tais observações possibilitaram verificar que a mortalidade das espécies de moluscos ocorria não somente pela infecção sofrida mas também devido às condições de manutenção em laboratório.

Na figura da página seguinte é verificado que o tempo de desenvolvimento do parasita, no hospedeiro intermediário, corresponde em média a 24 dias, resultado bem próximo do apontado por Coelho⁸.

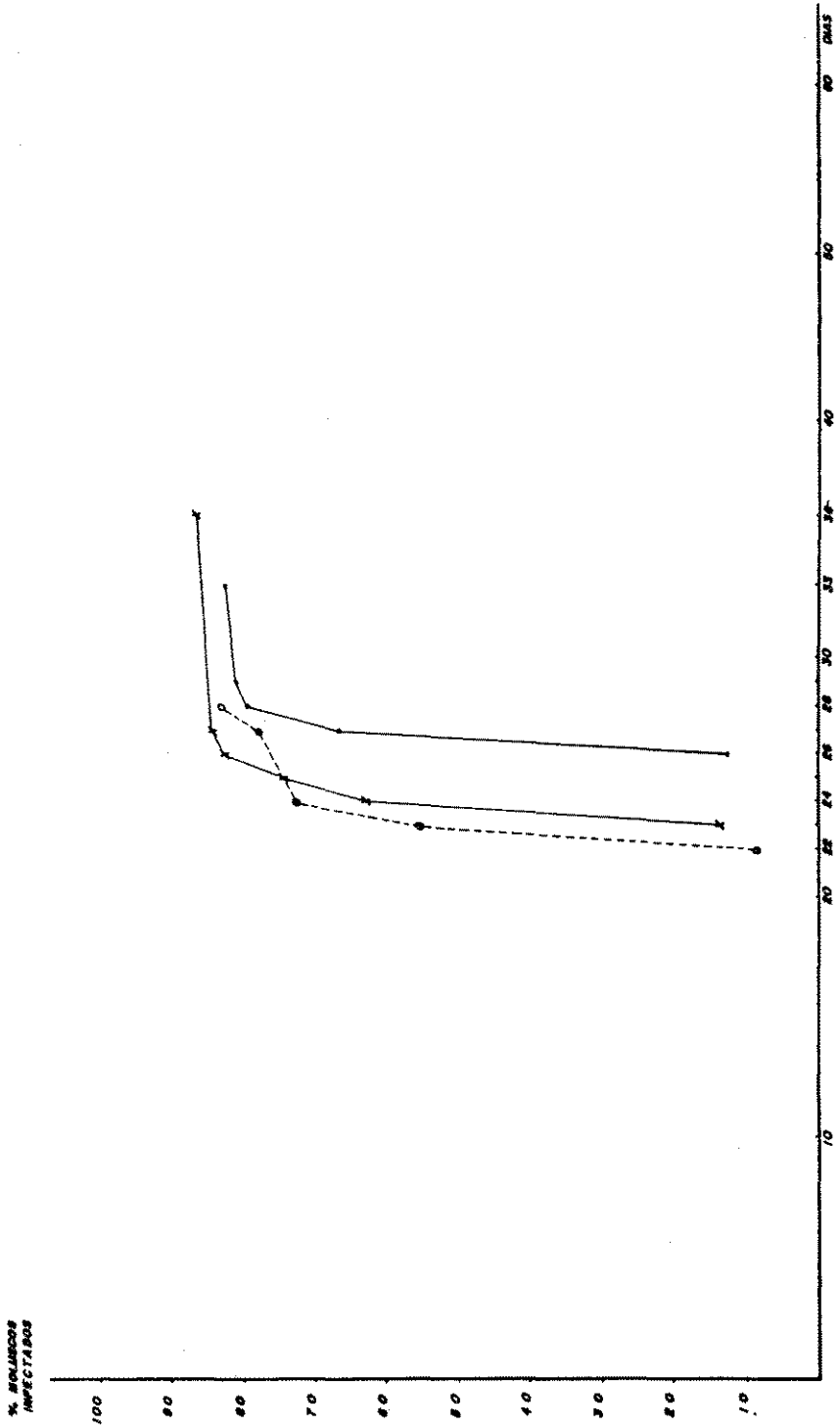


FIGURA — Percentual de positividade de *B. tenagophila*, por grupo, em função do número de dias de infecção.

TABELA

Resultados de infecção de *B. straminea* e *B. tenagophila* descendentes de exemplares capturados em Taubaté, SP, expostos a miracídios de cepa S.J. de *Schistosoma mansoni* do Vale do Paraíba.

Espécie de planorbídeo	Caramujos inoculados	Infecção com <i>S. mansoni</i> miracídios/caramujo	Espécie de planorbídeo					
			Sobreviventes*		Mortalidade		Moluscos Infectados	
			Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
<i>B. straminea</i>	100	05	81	(81,0)	19	(19,0)	—	—
	100	10	88	(88,0)	12	(12,0)	—	—
	50	20	45	(90,0)	05	(10,0)	—	—
	100	controle	82	(82,0)	18	(18,0)	—	—
<i>B. tenagophila</i>	100	05	73	(73,0)	27	(27,0)	60	(82,2)
	100	10	51	(51,0)	49	(49,0)	44	(86,3)
	50	20	36	(72,0)	14	(28,0)	30	(83,2)
	100	controle	60	(60,0)	40	(40,0)	—	—

* Sobreviventes no 60º dia de infecção.

Outro fato que nos parece de grande importância e que merece ser ressaltado é de que quanto maior o número de miracídios, mais rapidamente se dá a eliminação de cercárias, conforme evidência aquele gráfico. Foi observada ainda, no gráfico, uma sincronia no desenvolvimento de *S. mansoni* em *B. tenagophila*. Quase todos os moluscos (70 a 80%) passaram a eliminar cercárias em um mesmo intervalo de tempo, intervalo este de 22 a 26 dias após a infecção. Isto parece demonstrar que a cepa do trematoíde bem como a linhagem de *B. tenagophila*, acham-se bem adaptadas uma a outra.

Obtivemos ainda taxas de infecção relativamente altas, respectivamente 82,2; 86,3 e 83,2% para os lotes de 5, 10 e 20 miracídios por molusco, que pouco diferem entre si.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÃO

É recente a introdução de *B. straminea* no Vale do Paraíba¹². Seu primeiro encontro ocorreu no município de Cruzeiro onde, em exames dos exemplares coletados, constatou-se apenas uma única vez um exemplar eliminando formas larvárias de *S. mansoni*. Posteriormente, foi detectada em outros municípios da região a ocorrência da mesma espécie. Em todos os encontros, foi verificado que a dispersão achava-se relacionada com a

instalação de tanques para a criação de rãs com finalidade comercial. É importante ressaltar que em pesquisas subseqüentes, tanto no criadouro de Cruzeiro, como de outros municípios onde foi assinalada a presença de *B. straminea*, até o momento não foi encontrado nenhum exemplar eliminando formas larvárias de *S. mansoni* e também não se detectaram casos autóctones nessas áreas.

No experimento realizado, as taxas de infecção evidenciam alto grau de adaptabilidade de *B. tenagophila* à cepa S. J. de *S. mansoni*, ao contrário de *B. straminea*, que não se mostrou suscetível. CHIEFFI⁷ (1975) obteve para a linhagem *B. tenagophila* de São José dos Campos e cepa da mesma região 81,52% de infecção, ao utilizar 10 miracídios por molusco, taxa muito próxima da encontrada neste estudo.

O fato de os resultados das infecções experimentais terem demonstrado ausência de positividade e de não ter sido encontrado mais nenhum exemplar de *B. straminea* naturalmente infectado, leva a crer que até o momento entre a linhagem desse molusco e a cepa testada não se processaram fenômenos de adaptação parasito-hospedeiro, fato que propiciaria o estabelecimento do ciclo. Porém, sua presença é um fator importante na epidemiologia da esquistossomose mansoni no Vale do Paraíba.

SANTOS, L.; MARQUES, G.R.A.M.; COSTA, I.B.; MARQUES, C.C.A. & GOMES, M.R.O.M. — Comparative susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) and *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835) from Taubaté (state of São Paulo, Brazil) to infection with the strain of *Schistosoma mansoni* from Vale do Paraíba (state of São Paulo). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):59-63, 1987.

ABSTRACT: The susceptibility of *B. straminea* from the municipality of Taubaté, state of São Paulo, Brazil and of *B. tenagophila* to infection by strain of *Schistosoma mansoni* isolated in São José dos Campos (state of São Paulo) was comparatively tested under laboratory conditions. *B. straminea* specimens showed no susceptibility to infection by the strain employed while *B. tenagophila* showed susceptibility with the infection rates of 82.2, 86.6 and 83.2%, respectively for lots of 100, 100 and 50 specimens submitted to 5, 10 and 20 miracidia.

DESCRIPTORS: schistosomiasis mansoni; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria straminea*; *Biomphalaria tenagophila*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, F.S.; DORBIN, Jr., J.E & VIEIRA, A.E. — Inquérito preliminar sobre infecção de planorbídeos em alguns municípios de Pernambuco. *Publ. Avulsas Inst. Aggeu Magalhães*, 1: 9-124, 1952.
2. BARBOSA, F.S. & COELHO, M.V. — Qualidade de vetor dos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* no Nordeste do Brasil. I — Suscetibilidade de *A. glabratus* e *T. centrimetalis* à infecção por *S. mansoni*. *Publ. Avulsas Inst. Aggeu Magalhães*, 3:55-62, 1954.
3. BARBOSA, F.S. & FIGUEIREDO, T. — Susceptibility of the snail intermediate host of schistosomiasis from Northeastern Brazil to the infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12:198-206, 1970.
4. BASTOS, O.C.; SCHIAVOTELC, R.J.G. & RIBEIRO, M.L.J.F. — Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* do Estado de São Paulo à infecção por linhagem de *Schistosoma mansoni* da Baixada Maranhense (Maranhão-Brasil). *Rev. Saúde públ.*, 18:355, 1984
5. CARVALHO, O.S.; SOUZA, C.P. & FIGUEIREDO, P.Z. — Suscetibilidade de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) de Piripiri (Piauí, Brasil) a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). *Rev. Saúde públ.*, 14:224-9, 1980
6. CARVALHO, O.S.; ANDRADE, R.M. & SOUZA, C.P. — Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), de Itajubá (MG), à infecção pela cepa "LE" de *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907 de Belo Horizonte, MG (Brasil). *Rev. Saúde públ.*, 13:20-5, 1979.
7. CHIEFFI, P.P. — Suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias dos Estados de São Paulo e Paraná. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 17(2):92-6, 1975.
8. CUNHA, A.L. — *Esquistossomose mansoni*. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1970.
9. GERKEN, S.E.; ARAÚJO, M.P.T. & FREITAS, J.R. — Suscetibilidade da *Biomphalaria straminea* da região de Lagoa Santa (MG) ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 17(6):38-343, 1975.
10. OLIVEIRA, M.P.; ALMEIDA, E.L.; VIEIRA, I.; OLIVEIRA, M.H.R. — Criação de moluscos em terrários e aquários. *Lumina Spargere*, Juiz de Fora 5(1):55-65, 1968.
11. PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. — Susceptibility of *Australorbis tenagophila* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5(1):23-9, 1963.
12. SANTOS, L. — Primeiro encontro de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), no município de Cruzeiro, Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, naturalmente infectada por cercárias de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(2): 165-6, 1980.
13. SÃO PAULO. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) — *Avaliação anual de 1985 do Programa de Controle de Esquistossomose do SR-3*. Relatório. Taubaté, s.l. [Mimiogr.].
14. SOUZA, C.P.; RODRIGUES, M.S. & ARAÚJO, N. — Suscetibilidade de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) de Belo Horizonte (MG) à infecção por cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 23:188-93, 1981.
15. SOUZA, C.P.; ARAÚJO, N.; MADEIRA, N.G. & CARVALHO, O.S. — Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* de Belo Horizonte e adjacências à infecção com 3 cepas de *Schistosoma mansoni* (1). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 25(4):168-72, 1983.

NÍVEIS DE CONSERVADORES INTENCIONAIS EM SUCOS NATURAIS DE FRUTAS COMERCIALIZADOS NO BRASIL*

Helena Yuco YABIKU**
Mickiko Y. TAKAHASHI**
Maristela S. MARTINS**
Ronaldo HEREDIA**
Odair ZENEBO**

RIALA6/629

YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y.; MARTINS, M. S.; HEREDIA, R. & ZENEBO, O. — Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializados no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 65-75, 1987.

RESUMO: Quatrocentos e setenta e três amostras de sucos naturais de frutas do tipo integral, correspondentes a dezenove diferentes sabores de vinte e oito marcas comercializadas no Brasil, foram analisadas para a determinação dos níveis de dióxido de enxofre e de ácido benzóico. Os teores de dióxido de enxofre variaram desde valores abaixo de 10mg/kg (limite de detecção do método analítico empregado) até 1.439 mg/kg. Cinquenta e um por cento das amostras analisadas encontravam-se em desacordo com as disposições legais em vigor por apresentarem teores de dióxido de enxofre superiores ao limite máximo tolerado pela legislação brasileira, que é de 200 mg/kg. Com respeito ao conservador, ácido benzóico, somente seis amostras apresentaram teores ligeiramente superiores ao limite permitido, de 1.000 mg/kg.

DESCRITORES: dióxido de enxofre, ácido benzóico, em sucos naturais de frutas, determinação; sucos naturais de frutas, determinação de dióxido de enxofre e ácido benzóico em.

INTRODUÇÃO

O dióxido de enxofre e os sais minerais que podem produzi-lo, tais como, metabisulfito e bisulfito de sódio ou potássio, conhecidos vulgarmente como agentes sulfitantes, representam a mais versátil classe de conservadores para alimentos.

O uso destes tipos de aditivos remonta há muito tempo, quando o dióxido de enxofre era empregado pelos antigos romanos para desinfecção de recipientes para conter vinho, devido a sua eficácia contra a proliferação de microrganismos. Atualmente, sabe-se que a sua ação contra bactérias é mais eficaz do que contra leveduras e bolores, porém, quando associado ao ácido benzóico ou seus sais, a sua amplitude de atuação é aumentada, encontrando emprego ideal para a conservação de sucos de frutas⁴.

Em frutas desidratadas, além da ação contra os microrganismos, o dióxido de enxofre tem a propriedade de retardar ou inibir possíveis alterações de aroma e coloração, mantendo suas características naturais e tornando o produto comercialmente atrativo.

O mecanismo proposto para esclarecer as propriedades referentes à ação estabilizadora do dióxido de enxofre ainda não está bem elucidado, porém, parece estar relacionado à estrutura enzimática da célula⁷.

O emprego desta classe de aditivos está regulamentado, na legislação brasileira, pelas resoluções 7/76 e 14/76, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde^{5,6} em vários tipos de alimentos.

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P. Apresentado no 3º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Florianópolis, 1987.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Na avaliação toxicológica estabelecida pela "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives" (JECFA), a ingestão diária aceitável (IDA) de sulfito de sódio (calculada em dióxido de enxofre), para o homem, é de 0,7 mg/kg de peso corpóreo⁸.

O ácido benzóico e seu sal de sódio são reconhecidos como inócuos quando utilizados em pequenas quantidades, na função de conservadores para alimentos, porém a ingestão de concentrações elevadas poderá ocasionar efeito adverso ao organismo, tal como sensação de queimadura das mucosas bucais¹. Sua ingestão diária aceitável está fixada em 5 mg/kg de peso corpóreo⁸.

Além de não serem tecnologicamente adequadas, quantidades elevadas destes conservadores poderão ocasionar problemas toxicológicos, principalmente o dióxido de enxofre, que tem IDA baixa, ao qual é atribuída a propriedade de ser iniciador de reações alérgicas em pequena população asmática³.

Fundamentado em denúncias surgidas de que os sucos naturais de frutas do tipo integral, dispo-

níveis no comércio, apresentariam teores elevados de dióxido de enxofre acima dos valores permitidos pela legislação brasileira que é de 200 mg/kg, tornou-se imperativo o levantamento dos níveis dos conservadores utilizados nestes produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 473 amostras de sucos naturais de frutas, de 19 sabores diferentes de 28 marcas distintas, disponíveis no mercado nacional, no período de outubro de 1986 a março de 1987. As amostras foram colhidas no comércio varejista por vários órgãos oficiais de fiscalização de diversos Estados do Brasil, e as diferentes marcas foram codificadas por letras maiúsculas do alfabeto.

Determinação de dióxido e enxofre

Foi utilizado o método de Monier Williams², com algumas modificações referentes ao ácido, à concentração do indicador e ao sistema de destilação usado, e esquematizado na figura 1.

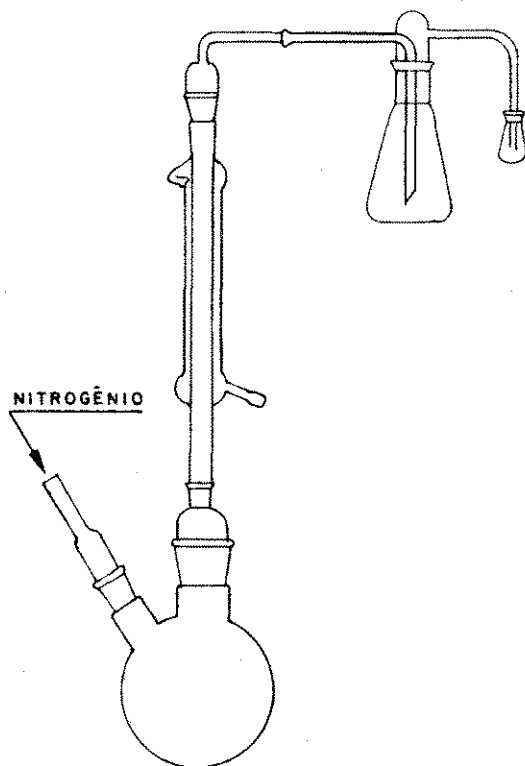


FIGURA 1 — Sistemas de destilação para determinação de dióxido de enxofre.

Reagentes

- Água oxigenada a 3%
- Ácido fosfórico 1:1
- Hidróxido de sódio 0,05 N
- Indicador azul de bromofenol a 0,4%

Procedimento

Pesar cerca de 30 g da amostra e transferir quantitativamente para o balão de reação do sistema. Adicionar 350 ml de água e 20 ml de ácido fosfórico 1:1. Transferir respectivamente 30 e 10 ml de água oxigenada a 3% para o frasco A e para o frasco B. Ligar o torpedo de nitrogênio e fazer passar corrente de nitrogênio à razão de 10 bolhas por minuto no frasco B. Aquecer o balão de reação de modo a manter a ebulição durante 30 minutos e não alterar o fluxo do gás que está sendo borbulhado. Transferir a solução do frasco B para o frasco A, lavando com 10 ml de água. Adicionar 3 gotas do indicador e titular com a solução de hidróxido de sódio 0,05 N. Titular um branco de 20 ml de água oxigenada nas mesmas condições.

Cálculo

$$\frac{(A - B) \times f \times 0,16}{P} = \text{dióxido de enxofre, por cento}$$

- A = nº de ml de solução de hidróxido de sódio 0,05 N gasto na titulação da amostra
- B = nº de ml de solução de hidróxido de sódio 0,05 N gasto na prova em branco
- P = nº de gramas da amostra
- f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,05 N

Determinação de ácido benzóico⁹

Reagentes

- Éter etílico
- Éter de petróleo
- Sulfato de sódio anidro
- Ácido clorídrico 1:1
- Solução estoque de benzoato de sódio
Dissolver 0,5900g de benzoato de sódio em água e diluir até 1000ml.
- Soluções-padrão de benzoato de sódio
Tomar 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 ml da solução estoque e diluir até 100 ml com água.

Procedimento

Pesar aproximadamente 1,5 g da amostra em um frasco Erlenmeyer de 100 ml com rolha esmerilhada e acidificar com 0,5 ml de ácido clorídrico. Adicionar 40 ml de éter etílico, 40 ml de éter

de petróleo e cerca de 5 g de sulfato de sódio anidro. Agitar. Filtrar para um balão volumétrico de 100 ml e lavar o Erlenmeyer e o filtro três vezes com éter etílico. Diluir até o volume com éter etílico. Preparar um branco tratando 1 ml de água nas mesmas condições. Ler em espectrofotômetro a 225 nm. Para obedecer à lei de Lambert-Beer, a concentração do ácido benzóico deve estar acima de 1 mg por 100 ml.

Curva-padrão: construir a curva padrão com as soluções-padrão e proceder como para a amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios correspondentes aos teores de dióxido de enxofre obtidos em todos os tipos de sucos analisados estão expressos nas figuras de 2 a 9.

Em todos os sucos de maçã, pêssego e morango analisados não foi detectado dióxido de enxofre. "Não detectado" significa que, se houver, o nível de dióxido de enxofre está abaixo de 10 mg/kg, que é o limite da sensibilidade do método utilizado.

Do total de 473 amostras analisadas, mais da metade (51%) apresentaram níveis de dióxido de enxofre acima do limite máximo permitido pela legislação vigente no Brasil, que é de 200 mg/kg.

As porcentagens de amostras condenadas, isto é, acima daquele limite para cada tipo de sabor, assim como os valores mínimo e máximo de dióxido de enxofre encontrados foram condensados na tabela 1. Estas variaram desde 100% no suco de graviola, 97% no suco de caju, e até 0% em vários tipos de sucos, como tomate, pêssego, limão etc.

Apesar de o dióxido de enxofre ter sido encontrado em todas as amostras de suco de graviola, os maiores teores foram apresentados no suco de caju, atingindo o máximo de 1.439 mg/kg. Este valor está sete vezes acima do permitido pela legislação. Se considerarmos a ingestão deste suco, devidamente diluído, por uma criança pesando 40 kg que, numa época de muito calor, poderia beber até 4 copos de suco em um dia, esta estaria ingerindo aproximadamente 80 mg/kg de dióxido de enxofre, valor muito acima do recomendado, que é de 28 mg/kg, tendo em vista que a ingestão diária aceitável é de 0,7 mg/kg de peso corpóreo por dia. Isto é crítico, pois a ingestão de grandes quantidades do agente sulfitante poderia acarretar efeitos adversos ao organismo, como náusea, diarreia, distúrbios gastrintestinais e manifestações cutâneas e, em se tratando de pessoas com

problemas asmáticos, sensíveis a esta substância, provocaria crise alérgica.

Todos os sucos analisados (exceção feita aos sucos especificamente mencionados) contêm mistura de substâncias conservadoras, dióxido de enxofre e ácido benzóico. A tabela 2 apresenta os valores de ácido benzóico encontrados nos mesmos.

Nos sucos de limão, tomate e pêsego não foi detectado ácido benzóico em nenhuma das amostras. A sensibilidade do método é de 100 mg/kg. Das 473 amostras analisadas, apenas seis apresentaram teores ligeiramente acima do permitido pela legislação vigente, que é de 1.000 mg/kg. Os valores variaram desde o mínimo de não detecção até o máximo de 1.439 mg/kg no suco de caju.

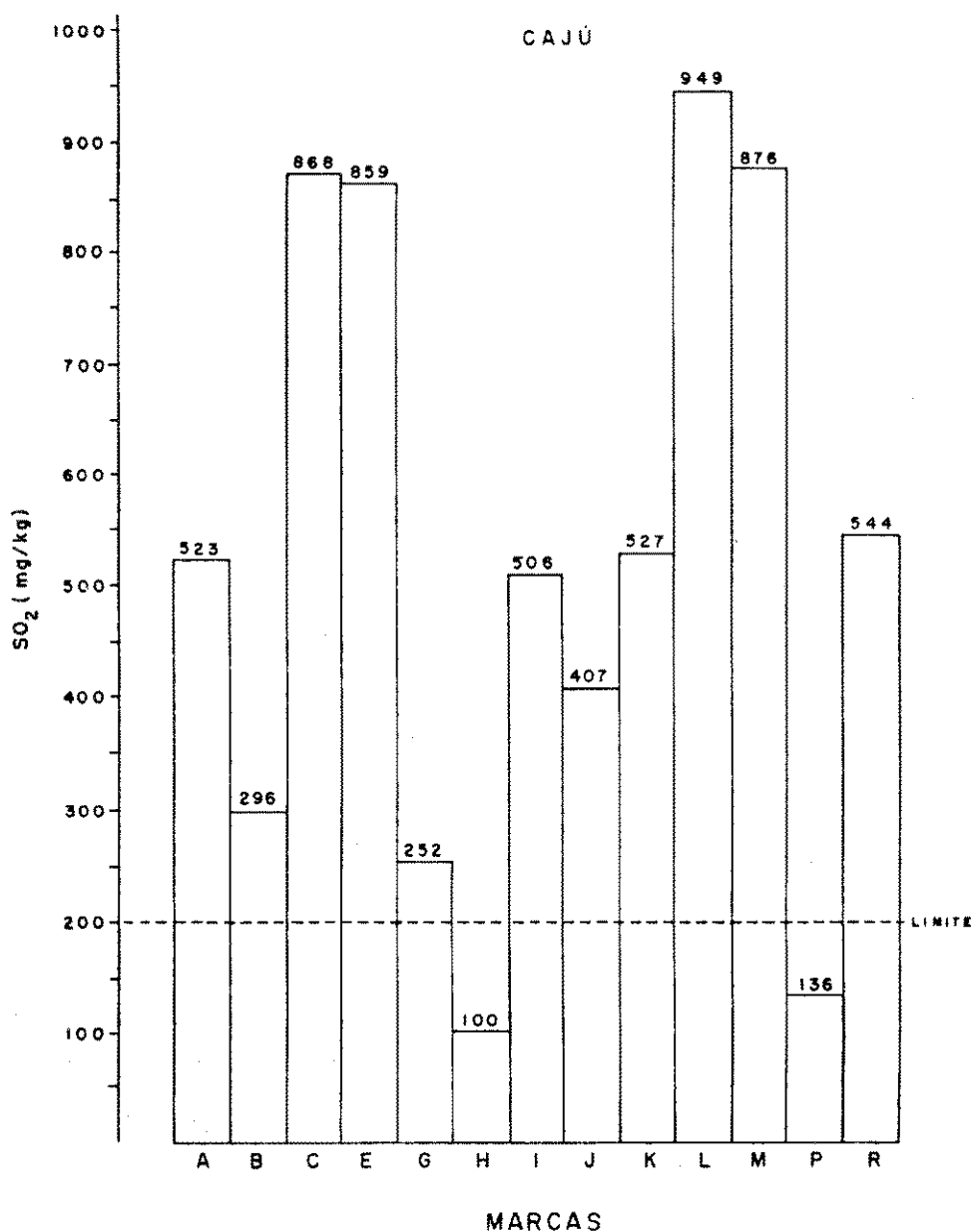


FIGURA 2 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de caju de diferentes marcas.

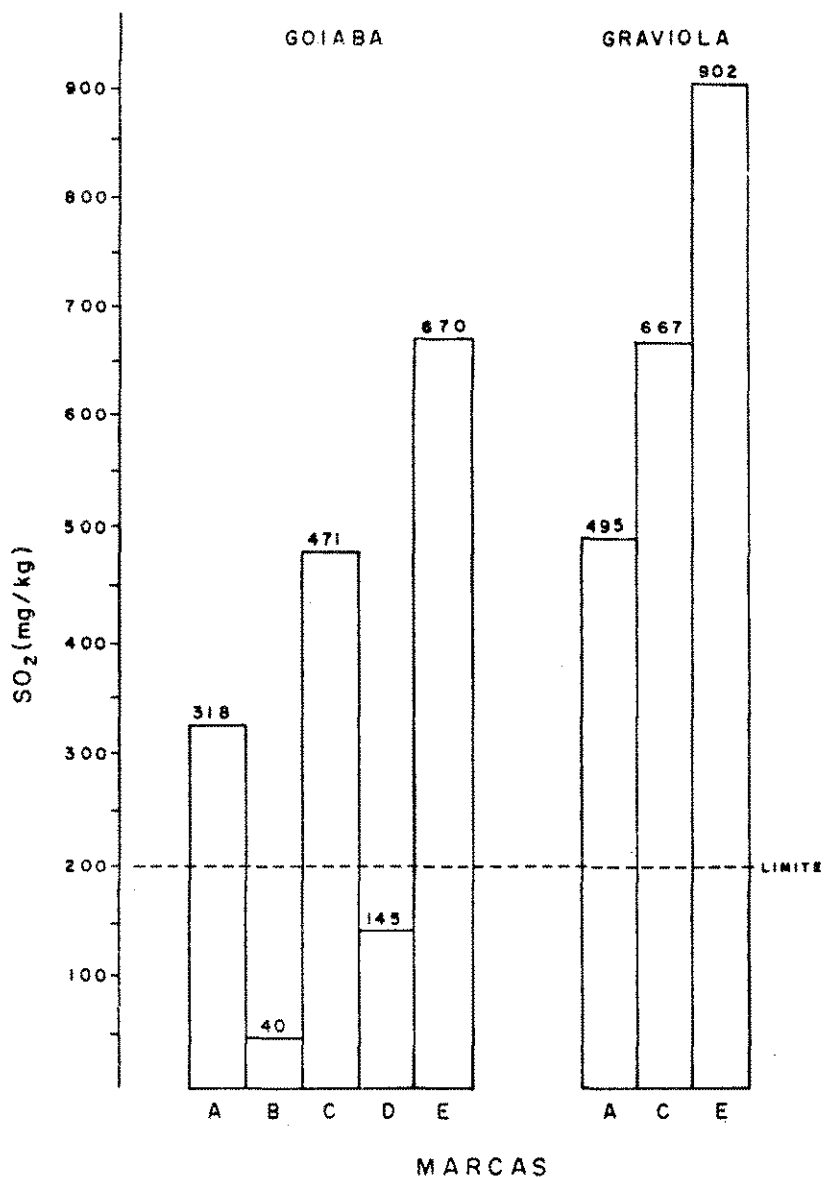


FIGURA 3 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de goiaba e graviola de diferentes marcas.

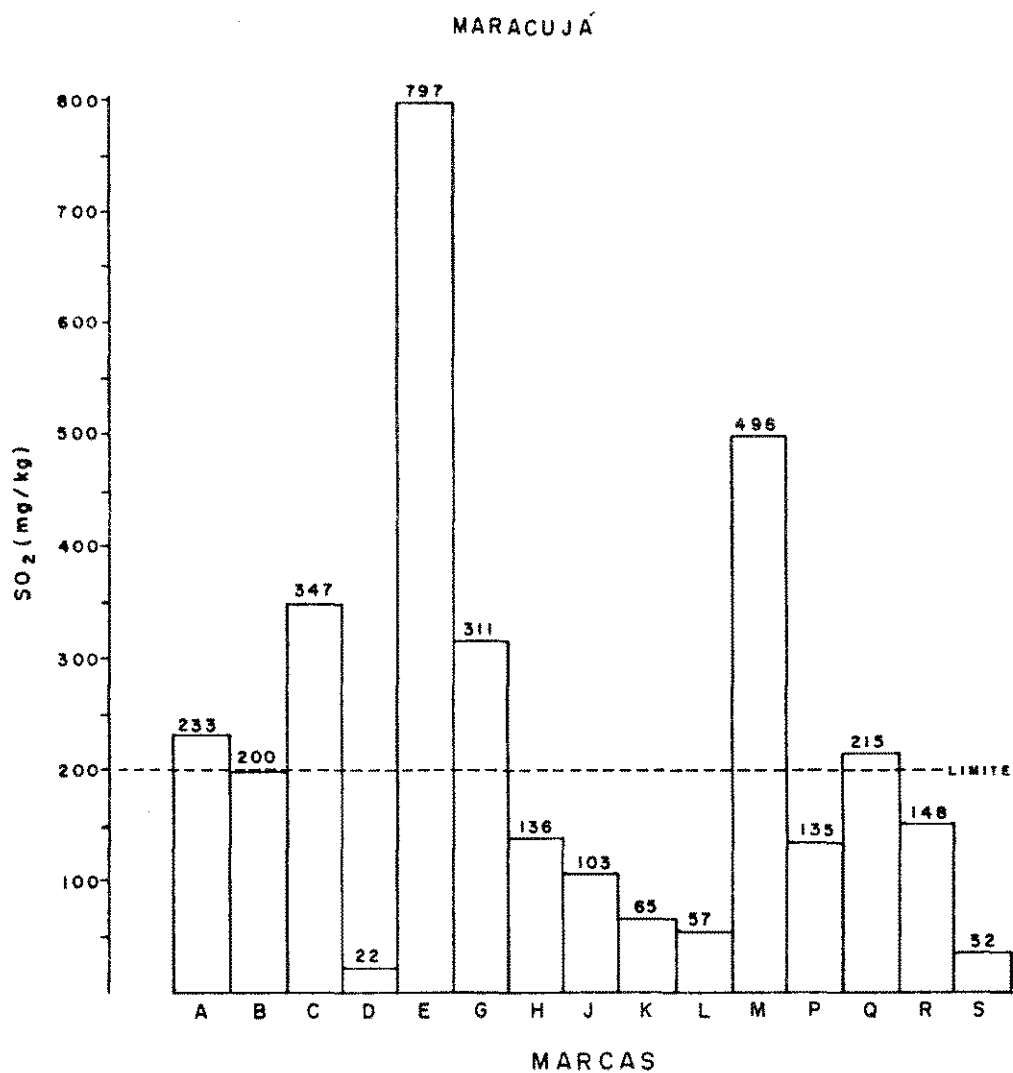


FIGURA 4 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de maracujá de diferentes marcas.

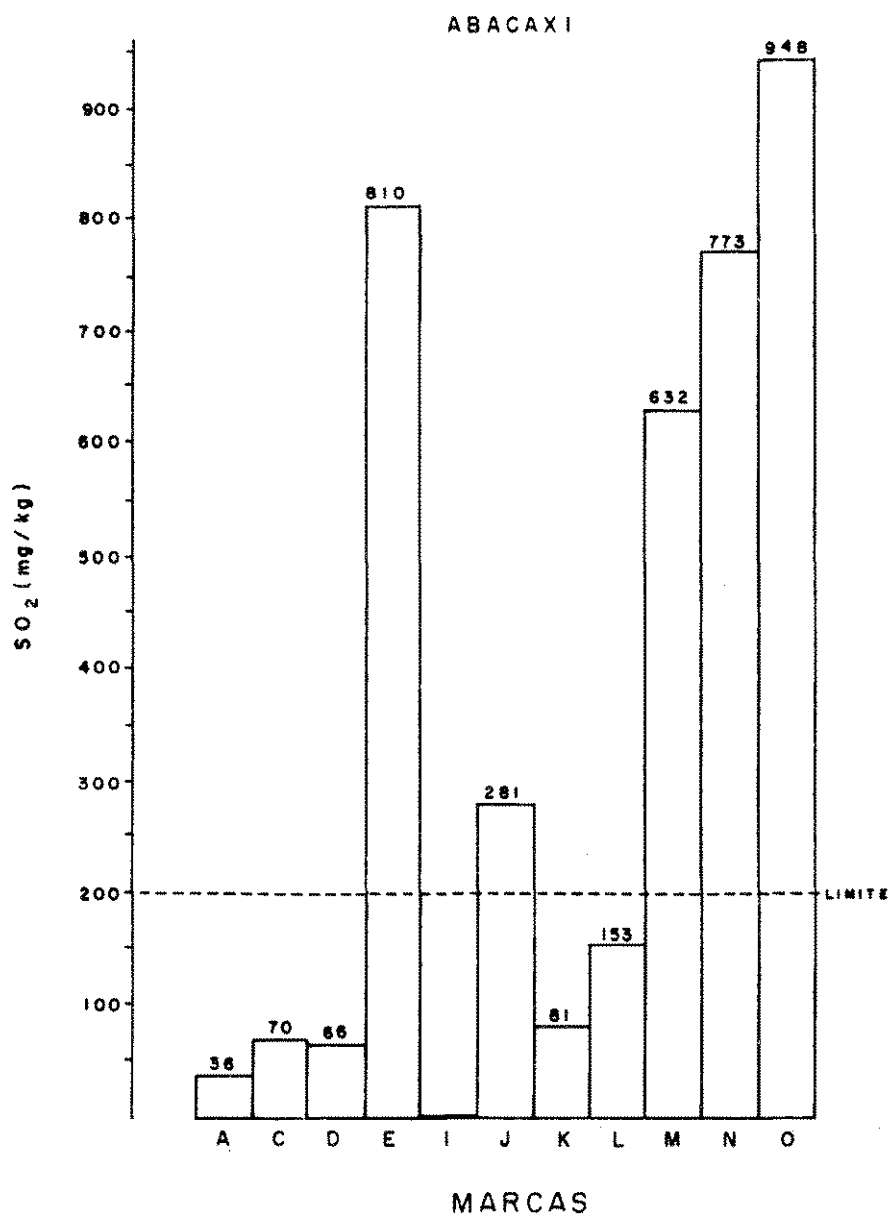


FIGURA 5 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de abacaxi de diferentes marcas.

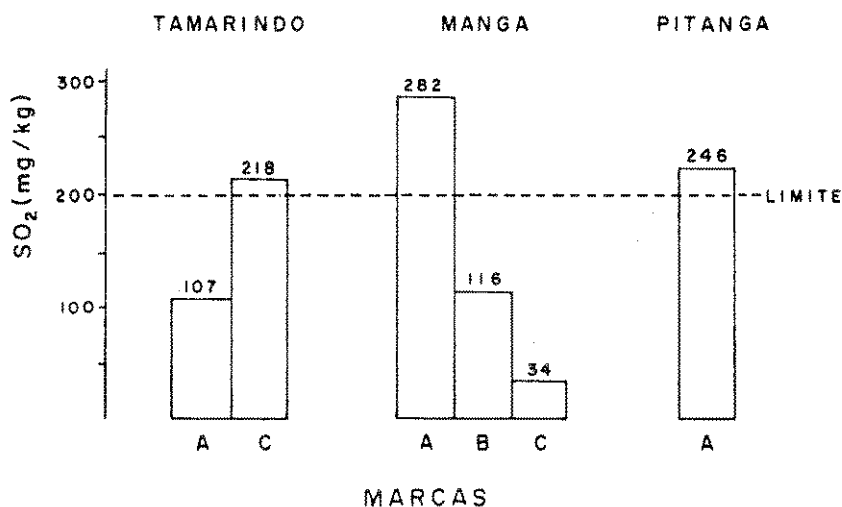


FIGURA 6 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de tamarindo, manga e pitanga de diferentes marcas.

TABELA 1

Níveis de dióxido de enxofre em sucos naturais de frutas de diversas marcas nacionais

Tipos de sucos	Nº de amostras analisadas	Valor mínimo	Valor máximo	Amostras condenadas %
		mg/kg	mg/kg	
Graviola	11	425	1099	100
Caju	128	78	1439	97
Goiaba	28	27	670	68
Maracujá	89	11	890	63
Manga	18	79	447	56
Pitanga	13	154	732	39
Abacaxi	55	ND*	1128	18
Uva	58	ND	325	9
Tamarindo	14	47	303	7
Frutas	14	ND	100	0
Tomate	8	ND	71	0
Maçã	6	ND	ND	0
Laranja	6	ND	111	0
Tangerina	5	38	114	0
Pêssego	5	ND	ND	0
Limão	4	ND	40	0
Mamão	4	ND	133	0
Banana	4	ND	91	0
Morango	3	ND	ND	0

* ND = Não detectado. Sensibilidade do método = 10 mg/kg.

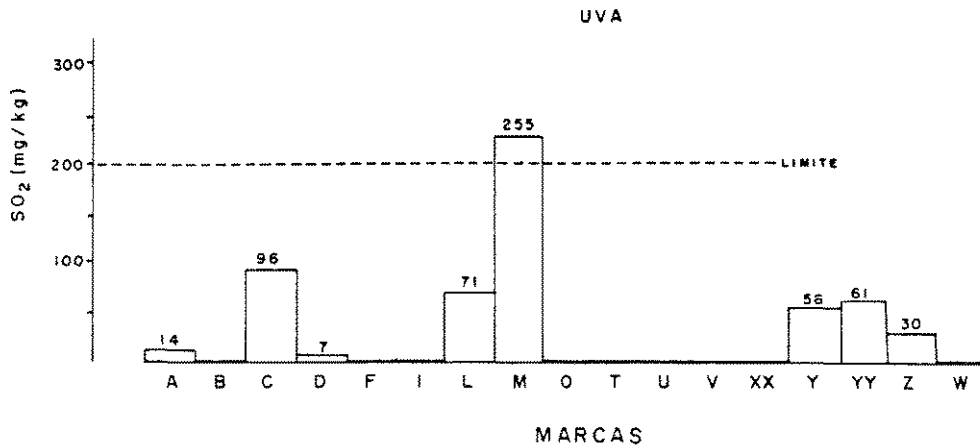


FIGURA 7 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de uva de diferentes marcas.

TABELA 2

Níveis de ácido benzóico em sucos naturais de frutas de diversas marcas nacionais

Tipos de sucos	Nº de amostras analisadas	Valor médio	Valor mínimo	Valor máximo
		mg/kg	mg/kg	
Graviola	11	755	200	1200
Caju	128	598	100	1300
Goiaba	28	452	ND*	800
Maracujá	89	569	ND	1100
Manga	18	364	ND	1000
Pitanga	13	654	400	900
Abacaxi	55	272	ND	1000
Uva	58	99	ND	900
Tamarindo	14	271	100	400
Frutas	14	350	100	700
Tomate	8	ND	ND	ND
Maçã	6	ND	ND	ND
Laranja	6	216	100	300
Tangerina	5	220	100	300
Pêssego	5	ND	ND	ND
Limão	4	ND	ND	ND
Mamão	4	41	ND	200
Banana	4	200	ND	800
Morango	3	167	ND	300

* ND = Não detectado. Sensibilidade do método é 100 mg/kg.

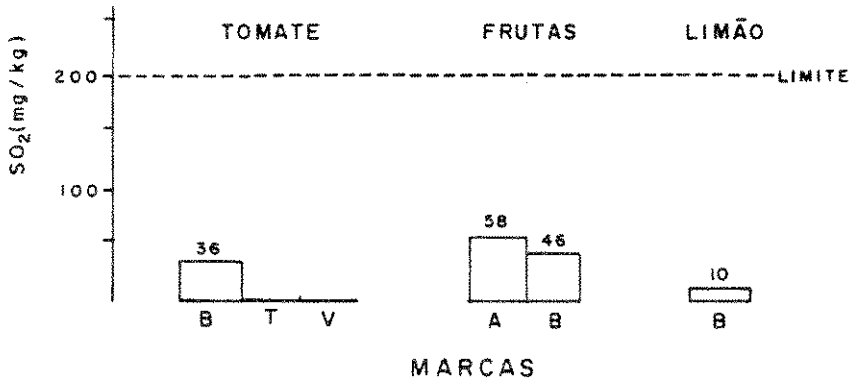


FIGURA 8 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de tomate, frutas (dois ou mais sabores) e limão de diferentes marcas.

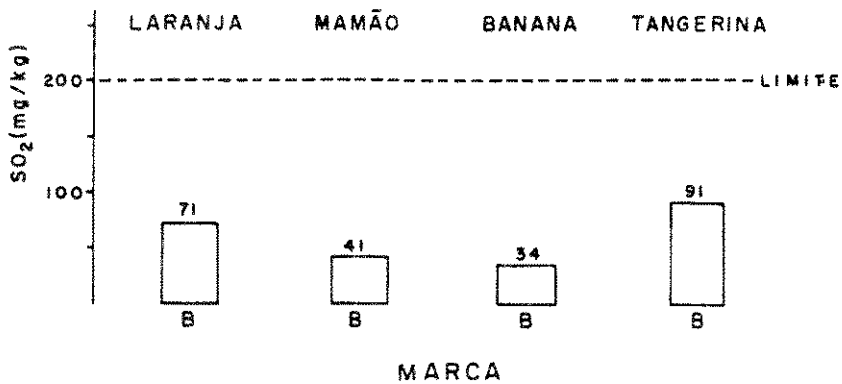


FIGURA 9 — Valores médios de dióxido de enxofre em sucos de laranja, mamão, banana e tangerina.

CONCLUSÃO

O presente levantamento revelou que uma grande percentagem de sucos naturais, do tipo integral, se apresentou com altos teores do conservador dióxido de enxofre, muito acima do máximo permitido pela legislação brasileira vigente.

Constatada a realidade do problema, os dados da pesquisa servirão como alerta para uma ação fiscalizadora mais intensa, e melhoria no controle de qualidade destes alimentos, assegurando a saúde do consumidor.

YABIKU, H.Y.; TAKAHASHI, M.Y.; MARTINS, M.S.; HEREDIA, R. & ZENEBO, O. — Levels of preservative substances intentionally added to natural fruit juices sold in Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):65-75, 1987.

ABSTRACT: The sulphur dioxide and benzoic acid content was determined in 473 samples of commercial natural fruit juices on sale in Brazil. The samples included 19 different fruit flavors furnished by 28 manufacturers. The sulphur dioxide levels varied from less than 10 mg/kg (sensitivity limit of the analytical method employed) up to 1,439 mg/kg. The maximum level tolerated by Brazilian laws (200 mg/kg) was violated by 51% of the samples tested. Only 6 samples showed a level of benzoic acid which was slightly above the tolerated level (1,000 mg/kg).

DESCRIPTORS: fruit juices, natural, determination of sulphur dioxide and benzoic acid in; sulphur dioxide, benzoic acid in natural fruit juices, determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, A.J. & CANHOS, V.P. — *Aditivos em alimentos*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, Coordenação da Indústria e Comércio, s.d. p. 141-143.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12th ed. Washington, A.O.A.C., 1980. p. 339-40.
3. BEHRE, L.M. — Sulfite food additives: to ban or not to ban? *Dairy Food Sanitat.*, 6:386-90, 1986.
4. BORGSTROM, G. — *Principles of food science*. New York, MacMillan, 1968, v.1, p.299.
5. BRASIL, leis, decretos, etc. — Resolução normativa n^o 07/76 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 17 set. 1976. Seção I, pt.1, p.12299.
6. BRASIL, leis, decretos, etc. — Resolução normativa n^o 14/76 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 14 jul. 1976. Seção I, pt.1, p.9438.
7. GAVA, A.J. — Emprego de conservadores em alimentos. *Bol. Soc. bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, 18:190-1, 1984.
8. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES — Geneva, 1983. *Evaluation of certain food additives and contaminants*. 27th Report. Geneva, WHO, 1983. p.20-1. (Technical Report Series 696).
9. SÃO PAULO — Instituto Adolfo Lutz — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3^a ed. São Paulo, 1985. p.92.

Recebido para publicação em 30 de julho de 1987.

DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS E ADENOVÍRUS NA GRANDE SÃO PAULO NO PERÍODO 1984-1986. ESTUDO ELETROFORÉTICO DO GENOMA DOS ROTAVÍRUS*

Maria do Carmo S.T. TIMENETSKY**
Denise de Sousa LAZAROTTI**
Jonas KISELLIUS**
Helio G. PEREIRA***

RIALA6/630

TIMENETSKY, M.C.S.T.; LAZAROTTI, D.S.; KISELLIUS, J. & PEREIRA, H.G. —
Detecção de rotavírus e adenovírus na Grande São Paulo no período 1984-1986. Estudo
eletroforético do genoma dos rotavírus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 77-85, 1987.

RESUMO: No período de 1984 a 1986, 285 amostras de fezes de crianças com
sintomatologia diarréica foram submetidas às provas diagnósticas de ensaio
imunoenzimático, eletroforese em gel de poliacrilamida e microscopia eletrônica. Destas
amostras, 15,4% foram positivas para rotavírus e 3,2% para adenovírus. Das 44 (15,4%)
amostras positivas para rotavírus pelo método imunoenzimático, 37 apresentaram perfil
eletroforético do RNA característico dos rotavírus. Destas últimas, 27 foram analisadas
segundo o esquema de Lourenço et alii, 1981, tendo sido verificada grande heterogeneidade
de perfis e predominância dos rotavírus do subgrupo 2. No período estudado, apenas uma
amostra do rotavírus do subgrupo 1 foi detectada.

DESCRITORES: diarréia infantil; adenovírus; rotavírus; genoma viral; RNA viral;
infecção por adenovírus; infecção por rotavírus.

INTRODUÇÃO

Numerosos trabalhos foram realizados sobre a
incidência, distribuição e importância da gas-
troenterite infantil em todo o mundo, destacan-
do-se os de HOLMES¹⁵, 1979 e WIATT et alii³⁵,
1981. Em nosso país, este problema tem sido in-
vestigado com mais frequência após os trabalhos
iniciais de LINHARES et alii²⁴, em 1977, em Be-
lém do Pará, CANDEIAS et alii³, em 1978 e
BALDACCI et alii², em 1979, em São Paulo. Vá-
rios autores nacionais^{10,16,21,22,23} têm apresentado
ou publicado dados referentes a surtos isolados
ou provenientes de materiais encaminhados para
diagnóstico etiológico da gastroenterite de pacien-
tes hospitalizados em enfermarias de pediatria, de
berçários, creches e de visitantes de postos de saú-
de. Raramente são encontrados na literatura na-
cional estudos etiológicos e soropidemiológicos

de surtos ou da frequência da infecção em popu-
lação normal de localidades ou de cidades brasi-
leiras^{17,32}.

A introdução, em 1983, por PEREIRA et alii³¹
do estudo eletroforético do genoma dos rotavírus
humanos no Brasil despertou, conseqüentemente,
o interesse por novos trabalhos que vêm sendo
publicados com sua colaboração sobre os tipos
eletroforéticos dos rotavírus encontrados em nos-
so país¹⁶. O conhecimento da circulação desses ti-
pos eletroforéticos é de grande importância para
estudos epidemiológicos.

Recentemente, em novembro de 1986, comuni-
cações sobre a incidência, distribuição e impor-
tância da infecção por rotavírus em crianças e em
animais foram apresentados ao 3º Encontro Na-
cional de Virologia, realizado em São Lourenço,
M.G., Brasil.

* Realizado na Seção de Vírus Respiratórios, Entéricos e Outros do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Nosso trabalho apresenta os resultados obtidos com o estudo virológico das amostras de fezes enviadas ao nosso Serviço, provenientes de pacientes com diagnóstico clínico de gastroenterite, pertencentes ao grupo etário de 0 a 5 anos, moradores da Grande São Paulo. Os resultados obtidos são comparados aos encontrados em outras áreas do país para indicação da incidência da infecção e dos tipos eletroforéticos dos rotavírus humanos prevalentes nestas áreas geográficas.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de janeiro de 1984 a dezembro de 1986, recebemos 285 amostras de fezes de crianças de 0 a 5 anos de idade, que apresentavam sintomatologia diarréica. Estes materiais eram provenientes de hospitais e creches das redes públicas estadual e municipal, de alguns hospitais particulares, laboratórios regionais e centros de saúde da Grande São Paulo, que previamente foram incentivados a enviar fezes para o diagnóstico etiológico.

Estes materiais, quando não eram manipulados no dia, eram estocados a baixa temperatura (-70°C) até o momento de uso. Oportunamente, as amostras de fezes eram suspensas a 10% em tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 7,3, homogeneizadas vigorosamente com igual volume de FREON-113 e centrifugadas a 5.000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C. A fase aquosa era estocada a -70°C.

O método empregado para a detecção de rotavírus e adenovírus foi o ensaio imunoenzimático, pela técnica de duplo *sandwich*, de VOLLER et alii³⁴ e YOLKEN et alii³⁶, modificada por PEREIRA et alii²⁹.

A eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise do ARN viral foi feita pelo método de LAEMMLI²⁰, modificado por PEREIRA et alii³⁰. A detecção do rotavírus foi feita pela microscopia eletrônica, ou pela imunomicroscopia eletrônica, onde foi usada diluição ótima do soro hiperimune de coelho anti-SA-11. A técnica usada foi a de coloração negativa pelo silicotungstato de sódio, pH 7,2¹³.

No ensaio imunoenzimático (EIE) foi utilizado conjunto de reagentes fornecido pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz, onde os antígenos são captados em fase sólida por soros hiperimunes de cabras; a captura é detectada por soros hiperimunes de cobaias e revelada por soro de coelho anti-IgG de coabaia conjugado com peroxidase.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), os RNA virais foram extraídos das suspensões fecais com clorofórmio - fenol e precipitados com álcool etílico a -20°C, por 18 horas. A corrida eletroforética foi feita de acordo com técnica descrita por PEREIRA et alii³⁰. Em cada corrida foi incluído como padrão o RNA do rotavírus símio, amostra SA-11. A coloração do gel foi feita segundo HERRING¹⁴, com pequenas modificações, utilizando-se como corante o nitrato de prata.

As amostras positivas para rotavírus no EGPA foram classificadas segundo KALICA et alii¹⁸ e LOURENÇO et alii²⁵.

RESULTADOS

Das 285 amostras de fezes analisadas, 44 (15,4%) foram positivas para rotavírus e 9 (3,2%) forma positivas para adenovírus. Estes resultados que podem ser visualizados na tabela 1 exibem grande número de amostras até um ano de idade e razoável número de amostras na faixa etária de 1 a 2 anos, sendo o número de amostras inexpressivo nas restantes idades.

Ao estratificarmos a faixa etária de 0 a 2 anos, verificamos que esta não possui variação apreciável de positividade até o primeiro ano de vida; entretanto, verifica-se queda apreciável da positividade na faixa etária de 1 a 2 anos, para novamente se elevar esta positividade na faixa de 2 a 3 anos. Embora o número de amostras seja pequeno na faixa etária de 3 a 5 anos, não foi detectado qualquer rotavírus (tabela 2).

Na tabela 1, se considerarmos somente os dados de 0 a 3 anos, que são as amostragens de números mais consistentes, verificaremos que houve maior incidência de positividade tanto para rotavírus (23,3%) como para adenovírus (7,0%) na faixa etária de 2 anos.

Das 44 amostras de fezes positivas para rotavírus, 42 (95,4%) foram obtidas através de EIE, e 37 (84,0%) através da EGPA. De 97 amostras testadas pela microscopia eletrônica ou pela imunomicroscopia eletrônica (ME/IME), 22 (22,7%) foram positivas para rotavírus e somente uma (1,0%) para adenovírus. Também foram detectadas pela ME em 6 materiais (6,2%) partículas virais de cerca de 25-27 nanômetros que não puderam ser identificadas.

Em relação à concordância dos resultados nas 285 amostras examinadas, verificou-se que houve

TABELA 1

Número e percentagem de amostras fecais positivas para rotavírus e adenovírus analisadas no período 1984-1986, na Grande São Paulo

Grupo etário (anos)	Nº de amostras analisadas	Amostras positivas			
		Rotavírus		Adenovírus	
		nº	%	nº	%
0 -11	177	30	17,0	3	1,7
1 -12	51	4	7,8	2	4,0
2 -13	43	10	23,3	3	7,0
3 -14	10	0	0,0	1	10,0
4 -15	3	0	0,0	0	0,0
5 -16	1	0	0,0	0	0,0
Total	285	44	15,4	9	3,1

TABELA 2

Distribuição por faixa etária das amostras fecais positivas para rotavírus e adenovírus analisadas no período 1984-1986, na Grande São Paulo

Grupo etário (meses)	Nº de amostras analisadas	Amostras positivas			
		Rotavírus		Adenovírus	
		nº	%	nº	%
0 -1 6	143	24	16,8	3	2,1
6 -1 12	34	6	17,6	0	0,0
12 -1 24	51	4	7,8	2	3,9
24 -1 36	43	10	23,2	3	7,0
36 -1 60	14	0	0,0	1	7,1
Total	285	44	15,4	9	3,1

entre os métodos de EIE e EGPA concordância em 271 amostras (95,1%) e discordância em 14 amostras (4,9%).

Das 97 amostras examinadas pela ME, 23 foram positivas para rotavírus ou adenovírus e as restantes 74 amostras foram negativas para estes dois vírus. A concordância entre ME, EIE e EGPA para rotavírus foi de 90,7% (88 amostras) e a discordância foi de 9,2% (9 amostras).

Se nos limitarmos à concordância entre os três métodos, e considerarmos os resultados somente positivos, verificaremos que, de 28 materiais positivos pelo menos em um dos três métodos, somente 19 amostras (67,8%) foram positivas nos 3 métodos utilizados. Isto porque em 2 amostras a ME foi negativa e o EIE e o EGPA foram positivos; em uma amostra, a ME foi positiva enquanto que, nos outros métodos, foi negativa. Em três amostras, a ME foi negativa juntamente com o

TABELA 3

Comparação das técnicas imunoenzimática (EIE), eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e microscopia eletrônica ou imunomicroscopia eletrônica (ME/IME) para a detecção de rotavírus

EIE			EGPA			ME/IME			Total de amostras positivas	
Nº de amostras testadas	Amostras positivas		Nº de amostras testadas	Amostras positivas		Nº de amostras testadas	Amostras positivas			
	nº	%		nº	%		nº	%		
285	19	6,66	285	19	6,66	97	19	19,58	19	
	2	0,70		2	0,70		0	0,00	0	2
	3	1,05		0	0,00		0	0,00	0	3
	2	0,70		0	0,00		0	0,00	0	2
	0	0,00		0	0,00		1	1,03	1	1
	15	5,26		15	5,26		(***)	(***)	15	15
	1	0,35		0	0,00		(***)	(***)	1	1
	0	0,00		1	0,35		0	0,00	1	1
Total	42	14,72	Total	37	12,97	Total	20	20,61	44	

(***) = Exame não realizado.

EGPA, enquanto o EIE foi positivo. Finalmente, em outras 2 amostras a ME foi positiva juntamente com o EIE, e o EGPA foi negativo. Houve discordância em 9 (32,1%) das 28 amostras em que pelo menos um método resultou positivo para rotavírus. Estes dados podem ser visualizados na tabela 3. Por motivos técnicos algumas amostras não puderam ser analisadas pela IME.

Dos 37 casos positivos para EGPA, 27 foram estudados em relação ao seu perfil eletroforético. A tabela 4 demonstra os vários tipos eletroforéticos detectados na Grande São Paulo nos anos de 1984 a 1986.

No decorrer de 1984, em doze amostras o perfil eletroforético F(bcda) foi detectado em janeiro, o D(bbfa) em abril, o C(bbca) em junho e os dois B(bbba) em agosto e dezembro. Em 1985 foram detectados somente perfis eletroforéticos do tipo B(bbba) nas onze amostras positivas, assim distribuídas: uma em março, uma em agosto e quatro em setembro. Em 1986, de 21 amostras positivas uma E(bcba) e outra B(bbba) foram detectadas em fevereiro; em março, uma A(baba), uma H(caba) e cinco G(cbba); em abril, uma B(bbba);

em junho, julho, agosto e dezembro, uma A(baba) cada mês.

A única amostra do subgrupo 1(cacb), perfil curto, foi detectada em outubro de 1986, entre todas as 37 amostras estudadas nestes três anos. Todas as outras, com exceção de duas de perfil não determinado, pertenciam ao subgrupo 2.

Das onze amostras de 1985, quatro B(bbba) foram procedentes de surto de gastroenterite no Departamento de Pediatria do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, nos meses de agosto e setembro.

Em 1986, a partir de um surto de diarreia numa creche da prefeitura, foram estudadas 19 amostras de fezes, incluídas no presente trabalho, das quais 7 foram positivas para rotavírus no EIE; destas 7 amostras, 5 apresentaram perfil eletroforético compatível com o subgrupo 2 do tipo G(cbba).

Na figura da página seguinte apresentamos a incidência de rotavírus e adenovírus durante o período de 1984 a 1986, distribuídos nos doze meses do ano.

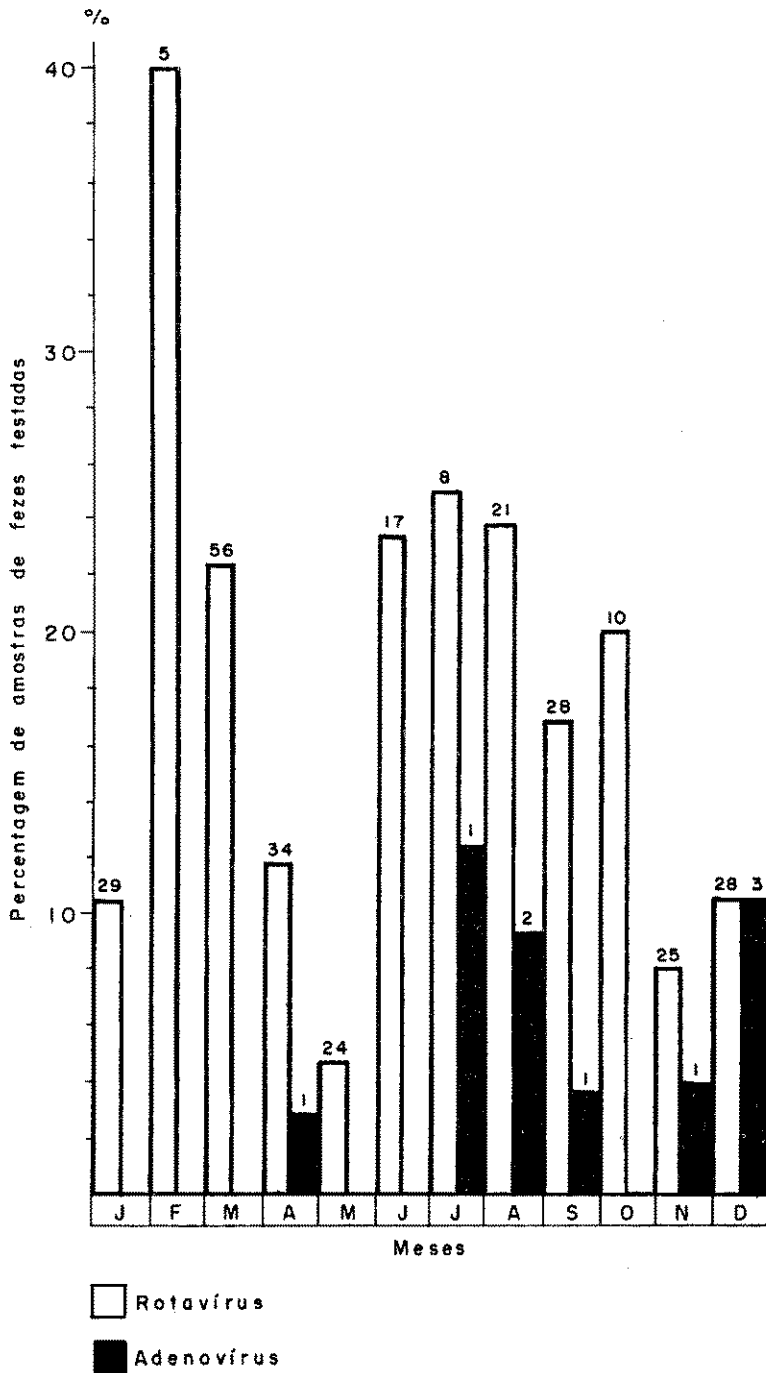


FIGURA 1 — Somatória de casos positivos para rotavírus e adenovírus distribuídos nos diferentes meses de 1984 a 1986.

TABELA 4

Resultados das eletroforeses dos RNA das amostras de fezes humanas positivas para rotavírus, da Grande São Paulo (1984-86)

Rotavírus Sub-grupos	Grupos eletroforéticos				Tipos eletrofo- réticos ^(*)	Distribuição de casos nos anos			Total
	I	II	III	IV		1984	1985	1986	
1	c	a	c	b	—	0	0	1	1
2	b	a	b	a	A	0	0	5	5
	b	b	b	a	B	2	6	2	10
	b	b	c	a	C	1	0	0	1
	b	b	f	a	D	1	0	0	1
	b	c	b	a	E	0	0	1	1
	b	c	b	a	F	1	0	1	2
	c	b	b	a	G	0	0	5	5
	c	a	b	a	H	0	0	1	1
Indeterminados	—	4	3	3	10
Eletroforeses negativas						3	2	2	7
Total de amostras analisadas						12	11	21	44

(*) = As letras maiúsculas são denominações dadas pelos autores para facilitar a compreensão do texto.

DISCUSSÃO

Embora tenhamos recebido 480 amostras no período fixado, somente 285 puderam ser avaliadas porque preenchiam os requisitos necessários para identificação, isto é, dados como sexo, idade e qualquer sintoma ou sinal compatível com o diagnóstico de gastroenterite.

Os resultados de 15,4% de pacientes positivos para rotavírus e 3,2% para adenovírus na faixa de 0 a 5 anos de idade eram esperados e comparáveis com outros achados de autores nacionais^{2,3,22,23}.

No exterior, vários autores têm estudado a incidência de rotavírus e adenovírus em crianças com diarreia. SEN et alii³³, em Calcutá, encontraram 7,6% de positividade para rotavírus; FAGBAMI et alii⁷, na Nigéria, encontraram 21,0% e PANON et alii²⁸, em New Caledonian, encontraram 14,2% para o mesmo vírus. Na Itália, CEVENINI et alii⁴, estudando crianças de 6 a 24 meses,

durante dois anos, encontraram 26,7% de rotavírus e 17,6% de adenovírus.

Recentemente, em 1986, no Rio de Janeiro, GUIMARÃES et alii^{11,12} estudaram crianças de favelas, achando 6,7% de positividade para rotavírus e 3,5% de positividade para adenovírus. Em Ouro Preto, M.G., LANNA et alii²¹ descreveram que no período de 1985 e 1986 foram encontrados 15,6% de amostras positivas para rotavírus e 4,1% de amostras positivas para adenovírus de pacientes com diarreia. GONTIJO et alii¹⁰, em Belo Horizonte, encontraram 21,05% de rotavírus positivos e 4,6% de adenovírus positivos no período de 1984 a 1985.

Nossos resultados para rotavírus apontam percentagem similar aos achados de GONTIJO et alii¹⁰ em relação à incidência na faixa etária de zero a 11 meses.

Em relação à distribuição dos números materiais (amostras testadas) nestes três anos, 1984 a

1986, agrupados nos respectivos meses, não pudemos inferir qualquer caráter sazonal da gastroenterite causada pelos rotavírus porque estes resultados são de materiais cuja sistematização de colheita infelizmente não esteve sob nosso controle. Entretanto, como se pode observar pelo gráfico construído (p. 81) na base da somatória de resultados positivos para rotavírus e adenovírus separadamente, e considerando arbitrariamente os resultados naqueles meses em que o número de materiais foi maior que uma dezena, verificamos que a distribuição dos casos positivos se mantém em patamares sem grandes variações mensais. Obviamente, não foi considerado o número apresentado em fevereiro e julho para os dois vírus pela exigüidade da amostragem.

Em geral, a sensibilidade dos métodos utilizados também mostrou resultados semelhantes aos relatados por outros autores^{1,11,30}.

Nossos resultados mostraram, tendo em vista o perfil eletroforético dos rotavírus, que em 1984 circularam pela Grande São Paulo quatro tipos eletroforéticos diferentes (bcda, bbfa, bbca, bbba) pertencentes ao subgrupo 2, perfil longo. Ademais, que em 1985 somente foi detectado o tipo eletroforético bbba, sendo que 4 amostras foram provenientes de surto de gastroenterite em berçário do Hospital Emílio Ribas e outras 2 amostras, de locais diferentes. Das 11 amostras positivas neste ano, 2 foram negativas em EGPA e 3 não foram analisadas quanto ao perfil eletroforético, por razões técnicas. Em 1986, circularam 6 tipos eletroforéticos diferentes de rotavírus do subgrupo 2 (bcba, bbba, baba, caba, cbba, bcda). Somente foi constatada a presença de uma única amostra positiva de rotavírus do subgrupo 1 (cacb).

É interessante comentar que em São Paulo, entre 1979 e 1981, foram detectadas 5 amostras do

rotavírus pertencentes ao subgrupo 1, perfil (cbcb), contrastando com nosso achado de somente uma amostra do subgrupo 1, perfil (cacb), nos três anos estudados (1984-1986). Cabe salientar, ainda, que tanto o perfil eletroforético da amostra do subgrupo 1 (cacb) quanto os perfis do subgrupo 2 por nós detectados diferem daqueles encontrados por PEREIRA et alii³¹, no Rio de Janeiro, São Paulo e Pará em 1979-1981. Já os perfis eletroforéticos do subgrupo 2 (bbba, bcba, cbba) foram detectados por nós e por HOULY et alii¹⁶ em Maceió, no período de 1982-1983.

Em nosso trabalho como em outros sobre o assunto^{5,6,8,19,26,27} verificou-se a grande heterogeneidade nos perfis eletroforéticos apresentados, atestando a grande variação genética do rotavírus, refletindo a predominância das infecções pelo rotavírus do subgrupo 2.

Se determinados perfis do rotavírus correspondem a maior ou menor infectividade, causando surtos de maiores proporções, não sabemos; entretanto, convém assinalar para futuras investigações que os rotavírus do subgrupo 2, perfis (bbba e cbba), foram responsáveis por surto de gastroenterite na enfermaria de hospital e na creche estudadas.

Agradecimentos

Ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes, Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração e sugestões durante a elaboração deste trabalho.

À Financiadora de Estudos e Projetos, FINEP, pelo auxílio financeiro para este trabalho, de acordo com o convênio nº 4.3.85.0101.00.

RIALA6/630

TIMENETSKY, M.C.S.T.; LAZAROTTI, D.S.; KISELLIUS, J. & PEREIRA, H.G. — Rotavirus and adenovirus detection in the Greater São Paulo, in 1984-1986. Electrophoretic study of the rotavirus genome. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):77-85, 1987.

ABSTRACT: In a period of 1984 to 1986, 285 faecal specimens from children with diarrhea were submitted to enzyme immunoassay, polyacrylamide-gel electrophoresis and electron-microscopy tests. Of the total 285 specimens, 15.4% was positive for rotavirus and 3.2% positive for adenovirus. Of 44(15.4%) positive specimens positive in enzyme immunoassay, 37 showed electrophoretic patterns proper to human rotavirus. Of these, 27 were analysed according to Lourenço's scheme (1981) showing a great heterogeneity of electrophoretic patterns and predominance of rotavirus of subgroup 2. Only one sample of rotavirus of subgroup 1 was detected in the study.

DESCRIPTORS: diarrhea, infantile; adenovirus; rotavirus; viral genomes; RNA, viral, genes, viral; adenovirus infections; rotavirus infections.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVENDANO, L.F.; DUBINOVSKY, S. & JAMES, H.D., Jr. — Comparación de la electroforesis del ARN vírico con el método ELISA indirecto para el diagnóstico de infección por rotavírus humano. *Bol. Of. sanit. panam.*, 97(1):1-7, 1984.
2. BALDACCI, E.R.; CANDEIAS, J.A.N.; BREVIGLIERI, J.C. & ORISI, S.J.E. — Etiología viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. *Rev. Saúde públ.*, 13:47-53, 1979.
3. CANDEIAS, J.A.N.; ROSENBERG, C.P. RÁCZ, M.L. — Identificação por contraímuno-electroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev. Saúde públ.*, 12:99-103, 1978.
4. CEVENINI, R.; VAROLI, O.; RUMPIANESI, F.; MAZZARACCHIO, R.; NANATTI, A. & La PLACA, M. — A two-year longitudinal study on the etiology of acute diarrhea in young children in Northern Italy. *Microbiologica*, 8(1):51-8, 1985.
5. DIMITROV, D.H.; GRAHAM, D.Y.; LOPEZ, J.; MUCHINIK, G.; VELASCO, G.; STENBACK, W.A. & ESTES, M.K. — RNA electrophoretotypes of human rotaviruses from North and South America. *Bull. WHO*, 62(2):321-9, 1984.
6. ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; DIMITROV, D.H. — The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. med. Virol.*, 29:1-22, 1984.
7. FAGBAMI, A.H.; JOHNSON, O.A. & DAVID-WEST, T.S. — Rotavirus infection in children presenting with acute gastroenteritis Ibadan, Nigéria. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 79(1):114-5, 1985.
8. FOLLETT, E.A.C.; SANDERS, R.C.; BEARDS, G.M.; HUNDLEY, F. & DESSELBERGER, U. — Molecular epidemiology of human rotaviruses. Analysis of outbreaks of acute gastroenteritis in Glasgow and the west of Scotland 1981/82 and 1982/83. *J. Hyg., Camb.*, 92:209-22, 1984.
9. FOSTER, S.O.; PALMER, E.L.; GARY, G.W., Jr.; MARTIN, M.L.; HERRMANN, K.L.; BEASLEY, P. & SAMPSON, J. — Gastroenteritis due to rotavirus in an isolated pacific island group: an epidemic of 3,439 cases. *J. infect. Dis.*, 141(1):32-39, 1980.
10. GONTIJO, J.G.; REIS, L.F.L.; PÉRES, J.N. & PENA, F.J. — Occurrence of rotavirus and adenovirus in acute diarrhoea in children in Belo Horizonte, M.G., Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3º, São Lourenço, 1986, p.31. *Resumos*.
11. GUIMARÃES, M.A.A.M.; VAZ, M.G.S.; NOZWA, C.M. & von HUBINGER, N.G. — Detection of adenovirus in stools of children in Rio de Janeiro city, R.J. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3º, São Lourenço, 1986, p.26. *Resumos*.
12. GUIMARÃES, M.A.A.M.; VAZ, M.G.S.; NOZWA, C.M. & Von HUBINGER, M.G. — Detection of human rotavirus by electron microscope, polyacrilamide gel electrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3º, São Lourenço, 1986, p.25. *Resumos*.
13. HASCHIMEYER, R.H. & MYERS, R.J. — Negative staining. In: HAYAT, M.A., ed. *Principles and techniques of electron microscopy*. New York, N.Y., 1972. p.99-147.
14. HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R. & MENZIES, J.D. — Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. clin. Microbiol.*, 16:473-7, 1982.
15. HOLMES, I.H. — Viral gastroenteritis. *Prog. med. Virol.*, 25:1-36, 1979.
16. HOULY, C.A.P.; UCHOA, M.M.M.; ZAIDAN, A.M.E.; GOMES-NETO, A.; OLIVEIRA, F.M.; ATHAYDE, M.A.G.; ALMEIDA, M.F.L.M. & PEREIRA, H.G. — Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Maceió, Brazil. *Braz. J. med. biol. Res.*, 19:33-7, 1986.
17. ISHAK, R.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y.; ISHAK, M.O. & CARDOSO, D.D. — Seroepidemiology of rotavirus in a population of children, Goiânia, Goiás, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 26(5):280-4, 1984.
18. KALICA, A.R.; GREENBERG, H.B.; ESPEJO, R.T.; FLORES, J.; WYATT, R.G.; KAPKIAN, A.Z. & CHANOCK, R.M. — Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect. Immunol.*, 33:958-61, 1981.
19. KONNO, T.; SATO, T.; SUZUKI, H.; KITAKA, S.; KATSUSHIMA, N.; SAKAMOTO, M.; YAZAKI, N. & ISHIDA, N. — Changing RNA patterns in rotaviruses of human origin: demonstration of a single dominant pattern at the start of an Epidemic and various patterns thereafter. *J. infect. Dis.*, 149(5):683-6, 1984.
20. LAEMMLI, Ü.K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, Lond.*, 227:680-5, 1970.
21. LANNA, M.C.S.; PÉRES, J.N.; TRÓPIA, M.J.M.; OLIVEIRA, S.M.S.; REGGIANI, R.L.; GOMES, J.A.S.; BARROS, M.E.S.; VALIE, H.S.F.; SOARES, G.M.; YOSHIKO-YAO, M.L.; CAMPOS, I.M.G.; REIS, L.N. & PIRES, M.R. — Estudo das diarreias infantis associadas ao rotavírus no Município de Ouro Preto, Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3º, São Lourenço, 1986, p.29. *Resumos*.

TIMENETSKY, M.C.S.T.; LAZAROTTI, D.S.; KISELLIUS, J. & PEREIRA, H.G. — Detecção de rotavírus e adenovírus na Grande São Paulo no período 1984-1986. Estudo eletroforético do genoma dos rotavírus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):77-85, 1987.

22. LINHARES, A.C.; MONÇÃO, H.C.; GABBAY, Y.B.; ARAÚJO, V.L.C.; SERRUYA, A.C. & LOUREIRO, C.B. — Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 77(3): 384-90, 1983.
23. LINHARES, A.C.; PINHEIRO, F.P.; FREITAS, R.B.; GABBAY, Y.B.; SHIRLEY, J.A. & BEARDS, G.M. — An outbreak of rotavirus diarrhoea among a nonimmune isolated South American Indian Community. *Am. J. Epidemiol.*, 113(6):703-10, 1981.
24. LINHARES, A.C.; PINHEIRO, F.P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G. & DIETRICH, P. — Rotavirus em Belém do Pará-Brasil. (Nota prévia). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 19(4):278-9, 1977.
25. LOURENÇO, M.H.; NICOLAS, J.C.; COHEN, J.; SCHERRER, R. & BRICOUT, F. — Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol.*, Paris, 132(E):161-73, 1981.
26. LOURENÇO, M.H.; NICOLAS, J.C.; SANTOS-FERREIRA, M.O. & BRICOUT, F. — Presence of three rotavirus electrophoretotypes in young children hospitalized in Lisbon in 1980-1981. *Ann. Virol.*, Paris, 133(E):95-106, 1982.
27. NICOLAS, J.C.; POTHIER, P.; COHEN, J.; LOURENÇO, M.H.; THOMPSON, R.; GUIMBAUD, P.; CHENON, A.; DAUVERGNE, M. & BRICOUT, F. — Survey of human rotavirus propagation as studied by electrophoresis of genomic RNA. *J. infect. Dis.*, 149(5):688-93, 1984.
28. PANON, G. & Le GONIDEC, G. — Rotavirus and infantile gastroenteritis in New Caledonia. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 77(3):263-70, 1984.
29. PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.; ANDRADE, Z.P. & De CASTRO, L. — A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. virol. Methods*, 10(1):21-8, 1985.
30. PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; FARIAS, V. & VIDAL, M.N.P. — Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 78:483-490, 1983.
31. PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. & TRABULSI, J.R. — Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg.*, Camb., 90(1):117-25, 1983.
32. SALLES-GOMES, L.F.; SAKUMA, M.E.; CURTI, S.P. & TAKIGUTI, C.K. — Frequência de anticorpos para rotavírus em habitantes da cidade de São Paulo em 1980-1982. *Rev. paul. Med.*, 101(4):127-32, 1983.
33. SEN, D.; SAHA, M.R.; NIYOGI, S.K.; NAIR, G.B.; DE, S.P.; DATTA, P.; DATTA, D.; PAL, S.C.; BOSE, R. & ROYCHOWDHURY, J. — Aetiological studies on hospital in-patients with acute diarrhoea in Calcutta. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 77(2):212-4, 1983.
34. VOLLER, A.; BARTLETT, A. & BIDWELL, D. — Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. clin. Pathol.*, 31:507-20, 1978.
35. WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; MEBUS, C.A.; KIM, H.W.; LONDON, W.T.; CHANOCK, R.M. & KAPIKIAN, A.Z. — Reovirus-like agents (rotaviruses) associated with diarrheal illness in animals and man. *Perspect. Virol.*, 10:121-45, 1981.
36. YOLKEN, R.H.; KIM, H.W.; CLEM, T.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; CHANOCK, R.M. & KAPIKIAN, A.Z. — Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:263-7, 1977.

Recebido para publicação em 18 de agosto de 1987.

ÓLEOS NATURAIS: VERIFICAÇÃO DE SUA QUALIDADE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA*

Elza S. Gastaldo BADOLATO**
Franca Durante de MAIO**
Leda C. A. LAMARDO**
Odair ZENEBO**

RIALA6/631

BADOLATO, E.S.G.; MAIO, F.D.; LAMARDO, L.C.A.; ZENEBO, O. — Óleos naturais: verificação de sua qualidade por cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):87-95, 1987.

RESUMO: O consumo crescente de produtos naturais, utilizados como alimentos ou como medicamentos, trouxe-nos a preocupação de verificar a qualidade de alguns desses produtos. Essa verificação foi realizada por cromatografia em fase gasosa, através de análise dos ácidos graxos de 60 amostras de óleo de amêndoas, 33 de óleo de germe de trigo, 16 de óleo de gergelim, 16 de óleo de alho, 14 de óleo de fígado de bacalhau e 8 de óleo de semente de uva. No caso dos óleos de germe de trigo e fígado de bacalhau foi também verificado, por via espectrofotométrica, o teor de vitaminas E e A respectivamente. Das amostras analisadas 79% dos óleos de germe de trigo, 77% dos óleos de amêndoas, 6 (38%) das de gergelim, e 2 (14%) das de fígado de bacalhau estavam falsificadas. Todas as amostras de óleo de semente de uva se apresentavam puras. Concluiu-se que a cromatografia em fase gasosa é um método adequado para a verificação da pureza de todos os óleos analisados.

DESCRITORES: óleos naturais, determinação de ácidos graxos em; óleos naturais, determinação de vitaminas em; óleos naturais, fraudes; cromatografia em fase gasosa.

INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de produtos naturais, tanto alimentos como medicamentos e cosméticos, trouxe a necessidade da verificação da qualidade destes produtos. Este aumento tem-se verificado devido a uma modificação de costumes proveniente de uma maior conscientização do consumidor, que vem buscando, cada vez mais, produtos com maior número de componentes naturais, e menos industrializados.

O objetivo deste trabalho é verificar a qualidade de óleos vegetais e animais comercializados como produtos naturais, muitos deles em cápsulas de gelatina, visto ser esta apresentação uma forma prática, de fácil ingestão e, por isso, largamente utilizada. Essa verificação foi efetuada através da análise do perfil cromatográfico dos ácidos graxos dos óleos de amêndoa, alho, gerge-

lim, semente de uva, germe de trigo e fígado de bacalhau, sendo que dos dois últimos foram também dosadas, por via espectrofotométrica, as vitaminas E e A, respectivamente.

Este tipo de preocupação, visando a qualidade e o aspecto farmacológico desses óleos, já foi objeto de estudo de outros autores. AFZAL et alii¹ pesquisaram a composição do alho (*Allium sativum*), visando uma possível utilização deste no controle da aterosclerose. KAMANNA & CHANDRASEKHARA¹² determinaram a composição dos lipídios totais e dos glico e fosfolipídios do óleo de alho. MANTIS et alii¹⁷ estudaram o efeito do extrato de alho sobre culturas de *Staphylococcus aureus*, demonstrando o seu poder germicida sobre esta bactéria.

Vários autores como NASSAR et alii¹⁹, RIKHTER²¹ e SAURA-CALIXTO et alii²⁵ estudaram a

* Realizado na Diretoria de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

composição do óleo de amêndoa, enquanto outros, como GUTFINGER et alii¹⁰ e SALVO et alii²³, pesquisaram a distinção entre o óleo de amêndoa e o de caroço de pêssego e de damasco (abricot), visando comprovar uma possível fraude no óleo de amêndoa por meio desses óleos.

GATTUSO et alii⁹ e KAMEL et alii¹³ determinaram a composição dos ácidos graxos do óleo de semente de uva, que atualmente está sendo bastante utilizado na fabricação de cosméticos, e como óleo comestível.

BRAR⁶ estudou as variações na composição de ácidos graxos de óleos extraídos de várias espécies de gergelim.

LANZA et alii¹⁶ determinaram a composição dos ácidos graxos do óleo de fígado de bacalhau, por cromatografia em fase gasosa, e fizeram um estudo das possíveis diferenças nos resultados obtidos quando se utilizam colunas capilares de diferentes comprimentos.

O óleo de fígado de bacalhau é uma das principais fontes naturais de vitamina A. Essa vitamina, segundo vários autores^{5,7 e 14}, apresenta-se neste óleo em diferentes concentrações que dependem de vários fatores, como espécie animal, sexo, idade, habitat e outros.

A composição dos ácidos graxos do óleo de germe de trigo foi pesquisada por BARNES & TAYLOR⁴, GABRIAL et alii⁸ e IVANOVA et alii¹¹.

O óleo de germe de trigo é uma fonte natural de vitamina E^{3,15 e 18} e seu doseamento foi pesquisado por diversos autores. RAO & PERKINS²⁰ identificaram e dosaram os tocoferóis e tocotrienóis utilizando a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa. SLOVER et alii²⁶ determinaram tocóis e tocotrienóis em sementes e óleos através de cromatografia em camada delgada, líquida e gasosa. SAKER et alii²² compararam o conteúdo de vitamina E presente nos óleos de germe de trigo, arroz e milho. Esses autores encontraram pequenas quantidades de vitamina E no óleo de germe de trigo, talvez devido à espécie do cereal analisada e outros fatores de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas amostras de diferentes procedências e de marcas variadas, adquiridas no comércio, e enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise por órgãos da fiscalização estadual, como o Departamento Estadual de Polícia do Consumidor (DECON) e o Centro de Vigilância Sanitária, assim discriminadas: 60 amostras de

óleo de amêndoa, 33 amostras de óleo de germe de trigo, 16 amostras de óleo de gergelim, 16 amostras de óleo de alho, 14 amostras de óleo de fígado de bacalhau e 8 amostras de óleo de semente de uva.

Foram extraídos em nosso laboratório os lipídios totais de amêndoa, de germe de trigo, de alho e de semente de gergelim para se estabelecer o perfil cromatográfico dos respectivos óleos e utilizá-los como padrões. Os lipídios assim extraídos, bem como todas as demais amostras, foram metilados segundo a técnica descrita por BADOLATO & ALMEIDA².

A análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi efetuada em um cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, acoplado a um integrador. Foi usada uma coluna de aço inoxidável empacotada com DEGS a 20% (succinato de dietileno glicol) sobre Chromosorb W/AW como suporte sólido, numa temperatura programada de 150 a 190°C.

Os principais ácidos graxos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os padrões cromatográficos destes ácidos.

As determinações das vitaminas A e E foram efetuadas a partir da saponificação das amostras, extração e reação colorimétrica, empregando a técnica descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz²⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia em fase gasosa dos ácidos graxos dos óleos de amêndoa, germe de trigo, fígado de bacalhau, uva e alho demonstrou que, dentre as amostras analisadas, o óleo de amêndoa e o de germe de trigo foram os que se apresentaram mais adulterados. Todas as amostras de óleo de semente de uva analisadas encontravam-se puras. Os resultados obtidos encontram-se reunidos na tabela 1.

Com relação às amostras de óleo de alho, verificou-se que não se tratava deste óleo e sim de uma mistura do óleo vegetal com extrato ou óleo essencial de alho, razão pela qual não foi possível estabelecer um perfil cromatográfico dos ácidos graxos desse óleo.

Dos óleos de amêndoa analisados, constatou-se que muitos deles eram totalmente substituídos por outro óleo vegetal, em sua maioria, óleo de soja ou amendoim, enquanto que outros eram misturas de óleo de amêndoa com esses mesmos óleos vegetais. A alguns desses óleos falsificados

TABELA 1

Avaliação da qualidade dos óleos naturais

Óleos	Amostras puras	Amostras falsificadas	Amostras analisadas
Óleo de amêndoa	14	46	60
Óleo de germe de trigo	7	26	33
Óleo de gergelim	10	6	16
Óleo de fígado de bacalhau	12	2	14
Óleo de semente de uva	8	—	8

foi adicionada essência artificial de amêndoa. Foi também estabelecido o perfil cromatográfico do óleo de amêndoa puro (fig. 1). A composição de seus ácidos graxos se encontra reunida na tabela 2.

TABELA 2

Composição dos ácidos graxos do óleo de amêndoa puro

Ácido graxo	Valor %		
	Mínimo	Máximo	Médio
Palmítico	6,3	8,6	7,1
Palmitoléico	0,5	0,8	0,7
Estearico	1,4	1,9	1,7
Oléico	59,2	67,5	62,6
Linoléico	24,4	32,1	28,6
Linoléico	tr*	0,7	0,1

* tr = traços.

TABELA 3

Composição dos ácidos graxos do óleo de germe de trigo puro

Ácido graxo	Valor %		
	Mínimo	Máximo	Médio
Palmítico	15,6	17,7	16,9
Palmitoléico	tr*	0,7	0,3
Estearico	0,3	0,9	0,6
Oléico	14,6	18,3	17,0
Linoléico	54,7	60,2	58,0
Linoléico	6,0	7,9	6,9

* tr = traços.

A falsificação do óleo de germe de trigo é efetuada pela substituição total ou parcial deste óleo

por outros óleos vegetais, principalmente de soja e de milho. Os resultados da composição dos ácidos graxos do óleo de germe de trigo puro encontram-se na tabela 3 e, na figura 2, tem-se o seu perfil cromatográfico característico.

Em todas estas amostras foi feita a dosagem espectrofotométrica da vitamina E, que faz parte da composição química dos óleos de germe de trigo. Verificou-se que algumas das amostras falsificadas, até mesmo algumas em que o óleo de germe de trigo foi totalmente substituído por outro óleo vegetal, apresentavam alto teor de vitamina E, concluindo-se que, provavelmente, foi adicionada vitamina E sintética a essas amostras ou substâncias interferentes foram dosadas como vitamina E. Por este motivo, concluiu-se que a dosagem de vitamina E não é um método adequado para se verificar a pureza do óleo de germe de trigo.

Todas as amostras de óleo de semente de uva analisadas revelaram o perfil cromatográfico característico do óleo puro (fig. 3). Na tabela 4 estão reunidos os dados referentes à composição dos ácidos graxos de óleo de semente de uva puro.

TABELA 4

Composição dos ácidos graxos do óleo de semente de uva puro

Ácido graxo	Valor %		
	Mínimo	Máximo	Médio
Palmítico	8,0	8,9	8,6
Palmitoléico	tr*	4,3	0,3
Estearico	3,3	4,5	3,7
Oléico	18,2	22,7	19,7
Linoléico	64,3	68,7	70,0
Linoléico	0,2	2,0	1,0

* tr = traços.

TABELA 5

Composição dos ácidos graxos de óleo de gergelim puro

Ácido graxo	Valor %		
	Mínimo	Máximo	Médio
Láurico	tr*	0,7	0,5
Mirístico	tr	0,2	0,2
Palmítico	7,9	9,7	9,0
Palmitoléico	tr	0,4	0,2
Esteárico	4,1	5,8	5,1
Oléico	36,9	42,4	38,9
Linoléico	46,5	49,1	47,6
Linolênico	tr	0,7	0,4

* tr = traços.

Verificou-se que a falsificação efetuada nos óleos de gergelim é feita pela substituição deste óleo pelo de amendoim, ou pela adição, principalmente, de óleo de coco ou algodão. A composição dos ácidos graxos de óleo de gergelim puro está na tabela 5 e seu perfil cromatográfico na figura 4.

Das amostras de óleo de fígado de bacalhau, apenas duas não revelaram o perfil cromatográfico característico deste óleo (fig. 5). Uma delas era óleo de peixe e, a outra, óleo de fígado de bacalhau falsificado com óleo de soja. Encontra-se na tabela 6 a composição dos ácidos graxos de óleo de fígado de bacalhau puro.

Em todas as amostras foi feito o dosamento de vitamina A, visto ser esta a principal vitamina das que fazem parte da composição química do óleo de fígado de bacalhau. Esta análise foi realizada por via espectrofotométrica. Os resultados da dosagem de vitamina A encontram-se na tabela 7.

TABELA 6

Composição dos ácidos graxos do óleo de fígado de bacalhau puro

Ácido graxo	Valor %		
	Mínimo	Máximo	Médio
Mirístico	2,3	5,3	4,1
Miristoléico	0,1	0,8	0,6
C 15:0	0,3	0,6	0,5
Não identificado	0,05	0,6	0,3
Palmítico	8,7	12,7	10,7
Palmitoléico	9,6	14,2	11,5
Margárico	0,8	1,3	1,1
C 17:1	1,2	2,0	1,4
Esteárico	1,6	3,5	2,6
Oléico	23,2	32,0	27,7
Linoléico	1,4	4,9	3,3
Araquídico	tr*	0,08	0,02
Linolênico	tr	0,9	0,2
Gadoléico	11,4	22,9	16,3
Araquidônico	tr	0,09	0,02
C 20:5	4,8	10,2	8,2
Erúcido	3,0	11,2	6,9
C 22:5	0,06	1,1	0,5
C 22:6	6,63	12,0	9,6

* tr = traços.

TABELA 7

Dosagem de vitamina A em óleo de fígado de bacalhau

Amostra nº	Vitamina A (U.I./100 g)
1	30.560
2	33.401
3	1.194*
4	25.735
5	56.992
6	35.127
7	36.094
8	25.425
9	24.958
10	42.589**
11	65.672
12	56.925
13	55.383
14	65.773

* Não é óleo de fígado de bacalhau.

** Óleo de fígado de bacalhau, falsificado pela adição de óleo de soja.

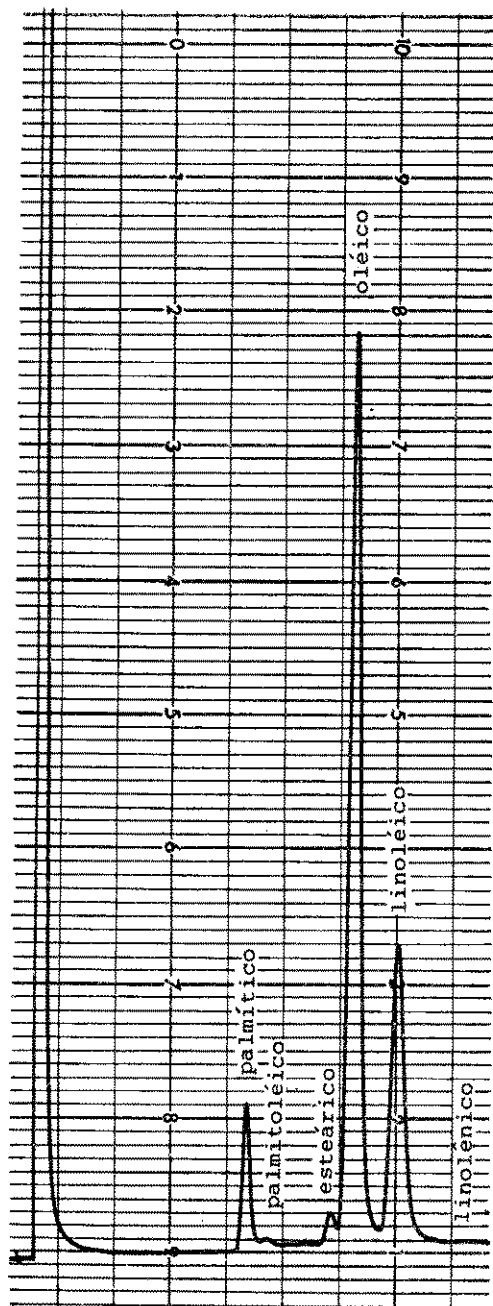


FIGURA 1 — Cromatograma de ácidos graxos de óleo de amêndoa puro.

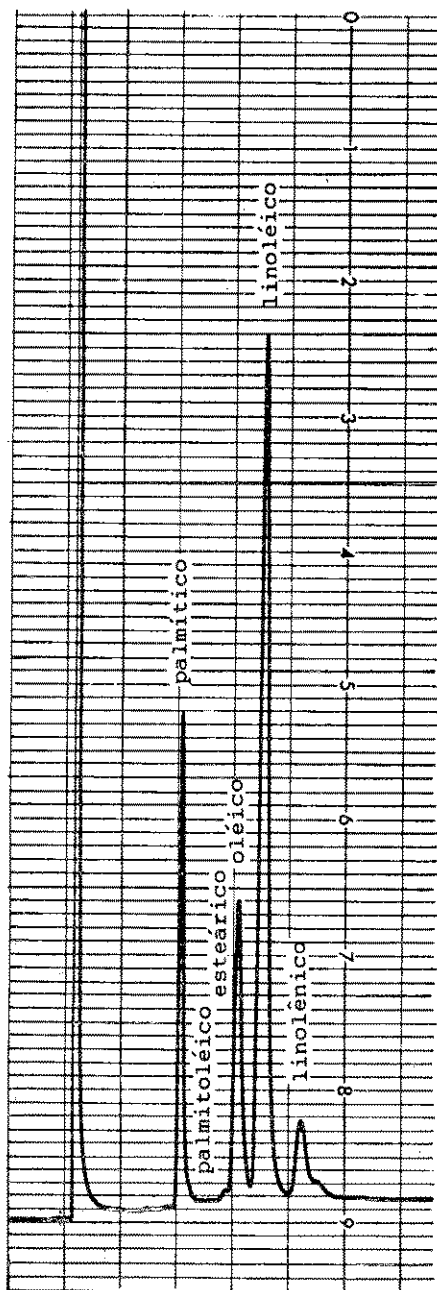


FIGURA 2 — Cromatograma de ácidos graxos de óleo de germe de trigo puro.

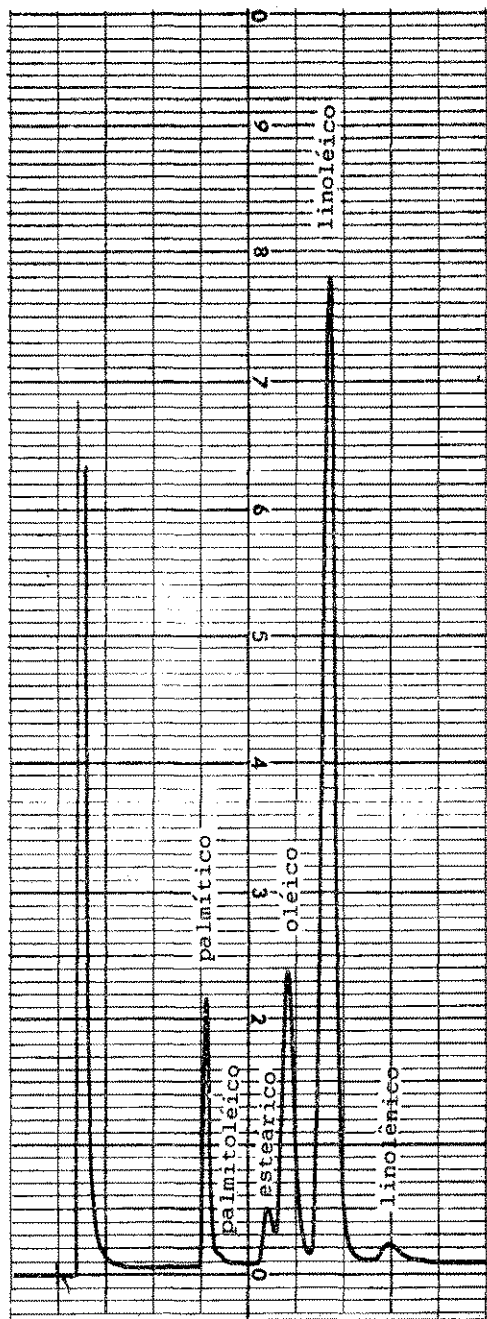


FIGURA 3 — Cromatograma de ácidos graxos de óleo de semente de uva puro.

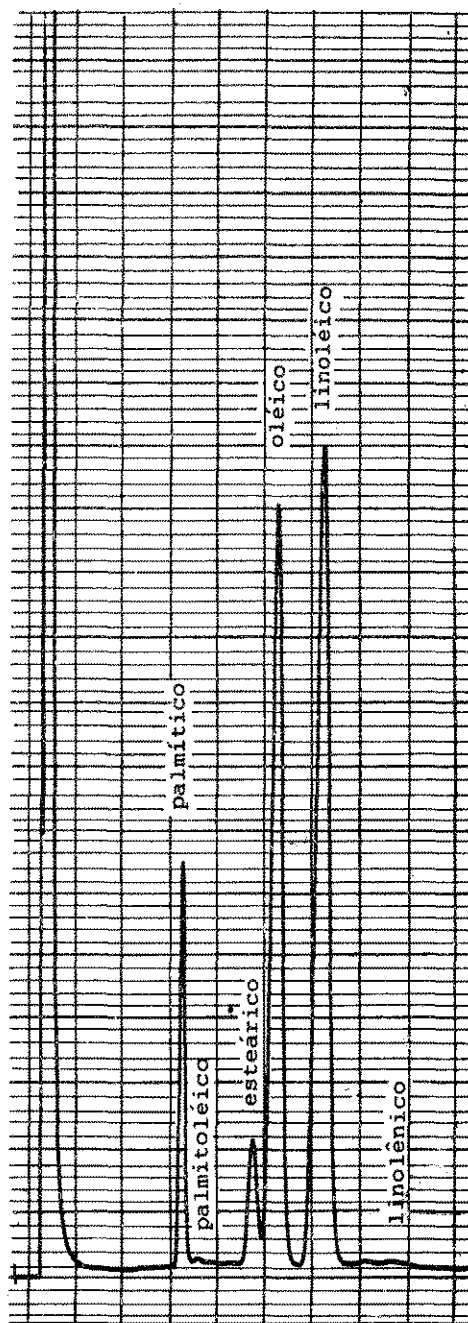


FIGURA 4 — Cromatograma de ácidos graxos de óleo de gergelim puro.

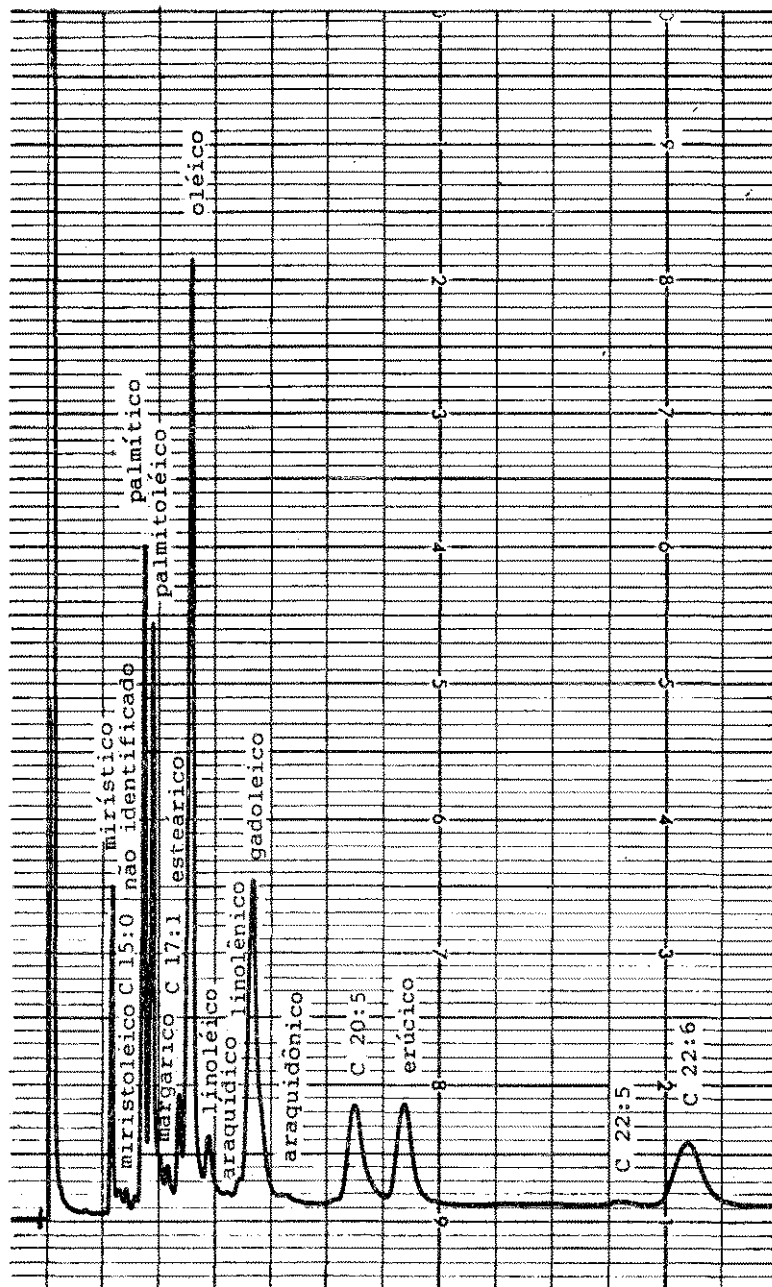


FIGURA 5 — Cromatograma de ácidos graxos de óleo de fígado de bacalhau puro.

CONCLUSÃO

A composição dos ácidos graxos dos óleos de amêndoa, germe de trigo, gergelim, semente de uva e fígado de bacalhau, por nós determinada, está de acordo com a encontrada por outros autores que estudaram os mesmos óleos.

Verificou-se que a cromatografia em fase gasosa é um método adequado tanto para a identificação dos óleos naturais como também para a detecção de fraudes efetuadas, seja pela substituição total do óleo, como pela adição de óleos vegetais ou animais.

Concluiu-se que a dosagem das vitaminas que fazem parte da composição dos óleos, em alguns

casos, não é um método adequado para a identificação ou determinação da pureza de óleos naturais, pois verificou-se que essas substâncias podem ser adicionadas a óleos fraudados.

A verificação da pureza dos óleos naturais é importante, pois a adulteração de alguns desses óleos não lesa apenas o consumidor, no aspecto econômico, mas pode trazer prejuízo à saúde porque, em muitos casos, esses produtos são ingeridos para suprir deficiências vitamínicas. A ingestão de vitaminas sem nenhum critério ou sem orientação médica pode causar sérios problemas à saúde, visto que tanto a falta como o excesso de vitaminas são prejudiciais ao organismo humano.

RIALA6/631

BADOLATO, E.S.G.; MAIO, F.D.; LAMARDO, L.C.A. & ZENEBON, O. — Search for frauds in commercial natural oils by gas-liquid chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):87-95, 1987.

ABSTRACT: The possible existence of frauds in natural oils retailed in Metropolitan São Paulo was investigated through determination of fatty acids. Gas-liquid chromatography was employed in all samples while spectrophotometry was employed for determination of vitamins A and E in cod liver oils and wheat germ oil. The total of 147 samples included 60 samples of almond oil, 33 of wheat germ, 16 of sesame oil, 16 of garlick oil, 14 of cod liver oil and 8 samples of grape seed oil. Frauds were detected in 26 (79%) samples of wheat germ oil, 46 (77%) of almond oil, 6 (38%) of sesame oil, and 2 (14%) samples of cod liver oil. All samples of grape seed oil were pure. It is inferred that gas-liquid chromatography is adequate for testing the occurrence of frauds in commercial natural oils.

DESCRIPTORS: oils, natural, determination of vitamins A and E in; oils, natural, determination of fatty acids; oils, natural, frauds; gas-liquid chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFZAL, M.; HASSAN, R.A.H.; EL-KAZIMI, A.A. & FATTAH, R.M.A. — *Allium sativum* in the control of atherosclerosis. *Agric. biol. Chem.*, 49:1187-88, 1985.
2. BADOLATO, E.S.G. & ALMEIDA, M.E.W. — Pesquisa por cromatografia em fase gasosa da adulteração de chocolates. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:47-56, 1977.
3. BAILEY, A.E. — *Industrial oil and fat products*. 4th ed. John Wiley, 1976. v.1, p.451-3.
4. BARNES, P.J. & TAYLOR, P.W. — The composition of acyl lipids and tocopherols in wheat germ oils from various sources. *J. Sci. Food Agric.*, 31:997-1006, 1980.
5. BORGSTROM, G. — *Fish as food*. New York, Academic Press, 1961. v. 1., p. 725.
6. BRAR, G.S. — Variations and correlations in oil content and fatty acid composition of sesame. *Indian J. agric. Sci.*, 52:434-9, 1982.
7. BRODY, J. — *Fishery by-products technology*. Westport, Conn., AVI, 1965. p.47-93.
8. GABRIAL, G.N.; SEDKI, A. & HEGAZI, S.M. — Triglycerids and fatty acids constituents of some cereal oil germs produced as by products of milling industry in Egypt. *Grasas y Aceites*, 34: 332-4, 1983.
9. GATTUSO, A.M.; FAZIO, G. & CILLUFFO, V. — II vinacciolo. Nota II. Caratteristiche e composizione dell'olio. *Riv. Soc. ital. Scien. alim.*, 12:47-54, 1983.
10. GUTFINGER, T.; ROMANO, S. LETAN, A. — Characterization of lipids from seeds of the Rosacea family. *J. Food. Sci.*, 37:938-40, 1972.
11. IVANOVA, B.; TARANDJISKA, R.; CHOBA-NOV, D. & POPOV, A. — Sur les groupes triglycéridiques de l'huile de germe de blé bulgare. *Revue fr. Corps gras*, 24:439-40, 1977.
12. KAMANNA, V.S. & CHANDRASEKHARA, N. — Fatty acid composition of garlic (*Allium sativum* Linnaeus). *J. am. Oil Chem. Soc.*, 57:175-6, 1980.

13. KAMEL, B.S.; DAWSON, H. & KAKUDA, Y. — Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 62:881-3, 1985.
14. KIRSCHENBAUER, H. — *Fats and oils: An outline of their chemistry and technology*. 2nd ed. New York, Reinhold, 1960. p.171-2.
15. LANGE, W. — Cholesterol, phytosterol, and tocopherol content of food products and animal tissues. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 27:414-20, 1950.
16. LANZA, E.; ZYREN, J. & SLOVER, H.T. — Fatty acid analysis on short glass capillary columns. *J. agric. Food Chem.*, 28:1182-6, 1980
17. MANTIS, A.J.; KARAIOANNOGLOU, G.; SPANOS, G.P. & PANETSOS, A.G. — The effect of garlic extract on food poisoning bacteria in culture media. 1. *Staphylococcus aureus*. *Food. Sci. Technol.*, 11:26-8, 1978.
18. MARTINENGI, G.B. — *Tecnologia chimica industriale degli oli, grassi e derivati*. 3^a ed. Milano, Ubrico Hoepli, 1963. p. 79-80.
19. NASSAR, A.R.; EL-TAHAWI, B.S. & EL-DEEN, S.A.S. — Chromatographic identification of oil and amino acid constituents in kernels of some almond varieties grown in Egypt. *Grasas y Aceites*, 28:387-91, 1977
20. RAO, M.K.G. & PERKINS, E.G. — Identification and estimation of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils using gas chromatography-mass spectrometry. *J. agric. Food. Chem.*, 20:240-5, 1972.
21. RIKHTER, A.A. — Oxidation of almond and walnut oils. *Appl. Biochem. Microbiol. (Engl. transl.)*, 16:446-50, 1981.
22. SAKER, A.; FAHMY, A.A. & ROUSHDI, M. — Evaluation of some chemical components in wheat, maize and rice germ oils. *Grasas y Aceites.*, 37:134-6, 1986.
23. SALVO, F.; DUGO, G.; D'ALCONTRES, I.S.; COTRONEO, A. & DUGO, G. — Composizione dell'olio di mandorle. Nota II: differenziazione dell'olio di mandorle dolci da sue miscele con olio di semi di pesce e di albicocco. *Riv. ital. Sostanze Grasse*, 57:24-6, 1980.
24. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 1.: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3^a ed. São Paulo, 1985. p. 379, 380, 395.
25. SAURA-CALIXTO, F.; CANELLAS, J. & GARCIA-RASO, A. — Characteristics and fatty acid composition of almond tegument oil — comparison with almond kernel oil. *Fette Seifen Anstrichm.*, 87(1):4-6, 1985 apud *Food Sci. Technol. Abstr.*, 17(9): 158, 1985. (Abstr. 9 N 40).
26. SLOVER, H.T.; LEHMANN, J. & VALIS, R.J. — Vitamin E in foods: determination of tocols and tocotrienols. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 46:417-20, 1969.

Recebido para publicação em 1 de setembro de 1987.

ESTUDO SOBRE ANTICORPOS HETERÓFILOS DESENVOLVIDOS NA MONONUCLEOSE INFECCIOSA*

Adelaide José VAZ**
Eide Dias CAMARGO**
Maria Luiza ALDRIGUI**
Marcos Vinicius da SILVA***
Ana Maria Carvalho de SOUZA**
Mirthes UEDA**

RIALA 6/632

VAZ, A.J.; CAMARGO, E.D.; ALDRIGUI, M.L.; SILVA, M.V.; SOUZA, A.M.C.
& UEDA, M. — Estudo sobre anticorpos heterófilos desenvolvidos na mononucleose
infecciosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 97-102, 1987.

RESUMO: Na mononucleose infecciosa (MI), o Epstein Barr virus induz a formação de anticorpos heterófilos. A dosagem desses anticorpos é considerada como um importante critério diagnóstico. Foram estudados 143 soros de pacientes com suspeita de MI, utilizando as técnicas de Paul-Bunnell-Davidsohn (PBD), teste de lágrima (TL) e hemolisina de boi (HB), previamente padronizadas. Foi introduzido o extrato de fígado de cobaia como antígeno, avaliando sua eficiência na absorção diferencial dos anticorpos heterófilos tipo PBD. Dos 143 soros estudados, 64 (45%), 80 (56%), 35 (24%) apresentaram títulos significativos, respectivamente nos testes de PBD, TL e HB. Na diferenciação dos anticorpos heterófilos PBD, realizada através da absorção com os três antígenos, rim de cobaia (R), fígado de cobaia (F) e estroma de boi (E), foram observados respectivamente 77%, 70%, e 58% apresentando resultados significativos para MI. O estudo estatístico dos resultados pelo teste Q de Cochran demonstrou que os três testes utilizados detectaram anticorpos heterófilos diferentes ($\chi^2 = 46,6$; $\chi^2_{5\%} = 5,99$), bem como, que os antígenos R e F podem ser utilizados indistintamente na absorção diferencial dos anticorpos heterófilos da MI ($\chi^2 = 1,33$; $\chi^2_{5\%} = 3,84$). Os resultados apresentados ressaltam a importância da utilização de mais de um teste na pesquisa de anticorpos heterófilos no diagnóstico da MI.

DESCRIPTORIOS: mononucleose infecciosa; anticorpos heterófilos na mononucleose infecciosa.

INTRODUÇÃO

No decurso da infecção por vírus Epstein Barr (EBV) há indução de grande variedade de anticorpos. Os principais são os anticorpos específicos contra diferentes antígenos do EBV e anticorpos heterófilos para eritrócitos de carneiro, cavalo e boi.

A dosagem de anticorpos heterófilos na mononucleose infecciosa tem sido considerada como um dos critérios diagnósticos.

A avaliação dos anticorpos heterófilos na mononucleose (MI) foi realizada pela primeira vez por PAUL & BUNNELL¹⁶ em 1932. Esses autores efetuaram a dosagem de aglutininas heterófilas anti-eritrócitos de carneiro, baseados nos dados dos trabalhos de DAVIDSOHN^{4,6} e DAVIDSOHN & RAMSDELL⁵ sobre a ocorrência de anticorpos desta natureza na doença do soro.

O teste de Paul-Bunnell (realizado com eritrócitos de carneiro) efetuava uma simples dosagem aglutinínica anti-eritrócitos de carneiro. Mais tar-

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto Adolfo Lutz e do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP.

de, foi padronizada uma técnica que permitiu distinguir as aglutininas para hemácias de carneiro, desenvolvidas na MI, das que ocorrem na doença do soro e em outras condições como hepatite, tuberculose, leucemia aguda, leucemia monocítica, doença de Hodgkin, nefrite crônica etc^{7,8,10}. Este teste tem sido conhecido como teste diferencial de Paul-Bunnell-Davidsohn.

Em 1935, BAILEY & RAFFEL² relataram a ocorrência de anticorpos anti-hemácia de boi na mononucleose infecciosa mas, somente em 1951, MASON¹⁵ padronizou o teste de hemolisina para hemácias de boi. Este teste foi introduzido no diagnóstico laboratorial por ser bastante sensível e específico.¹⁵

HOFF & BAUER¹³ descreveram um teste rápido e simples para a MI (monoteste) utilizando suspensão de eritrócitos de cavalo formolizados como antígeno. STUART et alii¹⁸, em 1936, já haviam relatado que os soros dos pacientes com MI aglutinavam eritrócitos de cavalo. No mesmo ano, BEER³ recomendou a utilização do teste de aglutinina para células de cavalo no soro, antes e após absorção com eritrócitos bovinos. DAV- IDSOHN¹¹, baseado nos estudos de HOFF & BAUER¹³, desenvolveu um teste rápido e simples para MI, empregando hemácias de cavalo, e estabeleceu ser este teste bastante específico. Estudos posteriores de LEE et alii¹⁴ conduziram à padronização do *spot-test*; estes autores concluíram que as hemácias de cavalo são mais sensíveis do que os eritrócitos de carneiro no diagnóstico da MI, possibilitando a detecção de níveis baixos de anticorpos, principalmente na fase inicial da doença. A técnica de absorção prévia do soro com extrato de rim de cobaia e estroma de hemácia bovina permite uma diferenciação indireta entre soros positivos e negativos para MI.

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente três testes sorológicos para detecção de anticorpos heterófilos, reação de PBD (hemácia de carneiro), teste de lágrima (hemácia de cavalo), hemolisina de boi (hemácia de boi), e também investigar o comportamento do fígado de cobaia como antígeno de absorção na reação de PBD, já que apresenta, como o rim, alto conteúdo de antígenos heterófilos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Soros

Foram estudadas amostras únicas de soro de 143 indivíduos encaminhados pelo Hospital Emílio Ribas e Centros de Saúde da rede estadual de São Paulo, com suspeita clínica de mononucleose infecciosa. Os soros foram inativados a 56°C durante 30 minutos e conservados a -20°C até o momento do uso.

2. Soluções

Solução salina (NaCl 0,15 M); *solução VBD* (NaCl 0,143 M, Dietilbarbiturato de sódio 0,005 M, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM, HCl 0,034 M - pH 7,4); *solução de B.R.K.** (NaCl 0,072 M; citrato de sódio 0,027 M, glicose 0,114 M - pH 6,1).

3. Antígenos e reagentes biológicos

Hemácias de carneiro: coletadas de três carneiros, em B.R.K., e estocadas a 4°C. As hemácias foram lavadas em solução salina e suspensas na mesma solução na concentração de 2% (v/v).

Hemácias de cavalo: coletadas em B.R.K., e estocadas a 4°C. Para o uso, as hemácias foram lavadas em solução salina e ressuspendidas a 2% em VBD, contendo 0,9% de leite desnatado**.

Hemácias de boi: coletadas em B.R.K. e estocadas a 4°C; as hemácias foram lavadas em solução salina e suspensas em VBD, na concentração de 1% (v/v).

Complemento: pool de soro de cobaias machos, foi liofilizado e estocado a 4°C. O lote de complemento foi testado, quanto à sua atividade complementar, pelo teste de hemolisina de hemácias de boi e ausência de atividade lítica das mesmas.

Extrato de rim de cobaia: rins coletados de cobaias machos e fêmeas, limpos, dos quais foi retirada a cápsula, lavados em solução salina e posteriormente homogeneizados em *Tissue Grinder****. O extrato homogeneizado foi lavado em solução salina e água destilada, alternadamente, por centrifugação. Após a obtenção da suspensão

* Solução de Bukantz, Rein & Kent.

** Molico^R.

*** Tissue grinder — Omni-Mixer Ivan Sorvall Inc., USA.

livre de hemoglobina, o sedimento foi tratado com acetona por quatro a cinco vezes. O sedimento final foi então dessecado a vácuo e pulverizado em gral. O rim pulverizado foi guardado em frascos herméticamente fechados e estocados a 4°C.

Extrato de fígado de cobaia: obtido como no procedimento descrito para o extrato de rim de cobaia.

Estroma de hemácias de boi: hemácias de boi foram lavadas e suspensas em solução salina na concentração final de 20%. Foram fervidas durante 60 minutos em banho-maria a 100°C, reconstituídas até o volume original com solução salina à qual se adicionou fenol na concentração final de 0,5% (p/v).

4. Testes sorológicos

Teste diferencial de Paul-Bunnell-Davidsohn: foram utilizados eritrócitos de carneiro como indicador da reação; foi realizado de acordo com a metodologia descrita anteriormente^{1,7,9}. Os soros com títulos superiores ou iguais a 1:56 na 1ª fase da reação foram tratados com três antígenos diferentes, separadamente: 40 mg de rim de cobaia, 60 mg de fígado de cobaia (adicionados a 1 ml de soro diluído a 1:5 em solução salina) e 0,8 ml de estroma de boi a 20% (adicionado a 0,2 ml de soro puro). As absorções foram realizadas por agitação durante 10 minutos, à temperatura ambiente, e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos.

Teste de hemolisina para hemácias de boi: foi realizado de acordo com as recomendações do "Center for Diseases Control (CDC)"¹². Os soros foram diluídos a partir de 1:10 em razão 2 até 1:1.280, em placas de microtitulação de poliestireno de fundo em U, em volume final de 0,025 ml. A cada diluição adicionou-se 0,025 ml de suspensão de hemácias de boi a 1% e igual volume de complemento diluído a 1:15 em VBD. Após a agitação, as placas foram incubadas a 37°C (banho-maria) por 30 minutos. A hemólise de 50% foi tomada como ponto final da reação, comparando-se com os padrões de lise realizados em paralelo. Títulos superiores ou iguais a 1:40 foram considerados significativos.

Teste de lágrima (tear-drop): foi realizado de acordo com EVANS et alii¹², modificado: diluições seriadas do soro absorvido com rim de cobaia com títulos variando de 1:10 a 1:2560, em VBD, foram feitas em placas de microtitulação de 96 cavidades, de fundo em V, no volume final de 0,050 ml; igual volume de suspensão de eritrócitos de cavalo foi adicionado a cada cavidade e a placa foi incubada a 37°C, por 2 horas, em banho-maria. A leitura da aglutinação foi feita colocan-

do-se a placa em posição vertical até a célula controle formar gota de lágrima. A maior diluição do soro que aglutinou as hemácias (ausência de lágrima) foi considerada como ponto final da reação. O *cut off* do teste foi considerado como 1:40.

Análise Estatística

A eficiência dos três testes aplicados aos soros foi analisada estatisticamente pelo teste *Q* de Cochran para três amostras relacionadas¹⁷. Também foi utilizado o teste de McNemar¹⁷ para comparação dos testes dois a dois. Esse teste foi utilizado para verificação do comportamento dos antígenos de rim e fígado de cobaia quanto à absorção de anticorpos heterófilos, no diagnóstico da mononucleose infecciosa.

RESULTADOS

Na tabela 1 é apresentada a distribuição etária e por sexo da população estudada e, na tabela 2, os resultados dos 143 soros ensaiados pelos testes sorológicos.

TABELA 1

Distribuição por sexo e idade dos 143 pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa

Idade \ Sexo	Masculino		Feminino		Total	
	N	%	N	%	N	%
0 - 10	28	19,6	20	14,0	48	33,6
10 - 20	19	13,3	16	11,1	35	24,4
20 - 30	9	6,3	19	13,3	28	19,6
30 - 40	3	2,1	5	3,5	8	5,6
40 - 50	2	1,4	1	0,7	3	2,1
50 - 72	1	0,7	1	0,7	2	1,4
ignorada	8	5,6	11	7,7	19	13,3
Total	70	49,0	73	51,0	143	100,0

No teste diferencial dos 64 soros com títulos superiores ou iguais a 1:56 na reação de PB, foram realizadas três absorções: antígenos de rim de cobaia, fígado de cobaia e de estroma de hemácias bovinas, sendo calculada a porcentagem de absorção para cada antígeno (tabela 3).

Os resultados dos três testes foram classificados como significativos ou não significativos para MI, e foram comparados entre si (tabela 4).

TABELA 2

Distribuição dos 143 soros de pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa, segundo teste sorológico e título obtido

Teste	Título	≤ 56	56	112	224	448	890	1792	3584	Total
	Paul-Bunnell		79	31	18	06	06	—	03	—
Teste	Título	≤ 40	40	80	160	320	640	1280	2560	Total
	Teste de lágrima		63	41	16	07	08	02	04	02
Hemolisina de boi		108	10	10	09	02	03	01	—	143

TABELA 3

Distribuição dos 64 soros de pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa com títulos significativos na 1ª fase da reação de Paul-Bunnell segundo antígeno utilizado na absorção diferencial e porcentagem (%) de absorção dos anticorpos heterófilos.

Antígeno	Porcentagem de absorção	TÍTULO						Total
		56	112	224	448	896	1792	
Rim da cobaia	50	2	3	—	—	—	—	5
	50 - 75	22	12	6	6	—	3	49
	75	7	3	—	—	—	—	10
Fígado de cobaia	50	—	2	1	—	—	—	3
	50 - 75	19	12	5	6	—	3	45
	75	12	4	—	—	—	—	16
Estroma de hemácias bovinas	50	2	4	—	—	—	—	6
	50 - 75	18	2	1	—	—	—	21
	75	11	12	5	6	—	3	37

TABELA 4

Resultados comparativos entre os testes sorológicos

		Teste de hemolisina de boi					Teste de lágrima					Teste de hemolisina de boi		
		NS	S	T			NS	S	T			NS	S	T
Teste de Paul-Bunnell	NS	77	02	79	Teste de Paul-Bunnell	NS	46	33	79	Teste de Lágrima	NS	60	03	63
	S	31	33	64		S	17	47	64		S	48	32	80
	T	108	35	143		T	63	80	143		T	108	35	143

NS – Soros não significativos.

S – Soros significativos.

T – Total de soros.

DISCUSSÃO

A mononucleose infecciosa é mais freqüente em crianças e adolescentes¹². A distribuição dos 143 soros escolhidos para o estudo (tabela 1) mostra que não houve diferença significativa quanto ao sexo, e que 68% dos pacientes com suspeita de mononucleose tinham idade entre 3 meses e 19 anos.

Os índices de sensibilidade e especificidade encontrados por EVANS et alii¹² para os testes de Paul-Bunnell, lágrima e hemolisina de boi foram respectivamente de 81% e 88,0%; 96,0% e 93,3% e 85,0% e 100%. Os autores observaram, ainda, que os anticorpos heterófilos detectados contra hemácias de boi e de carneiro retornam ao normal em dois a três meses, mas que os anticorpos anti-hemácias de cavalo persistem por um ano ou mais em 75% dos casos. Nossos resultados (tabela 2) podem ser explicados pelas considerações anteriores. Estes, quando submetidos ao teste χ^2 de Cochran, para comprovar se diferiam entre si, mostraram um χ^2 de 46,6 ($\chi^2_{2;5\%} = 5,99$), confirmando que os testes detectaram anticorpos heterófilos diferentes. A análise dois a dois dos testes também comprovou essas diferenças.

Com relação ao estudo do comportamento dos dois antígenos (tabela 3), o resultado ($\chi^2 = 1,33$; $\chi^2_{1;5\%} = 3,84$) demonstrou que os antígenos de rim e de fígado de cobaias podem ser utilizados indistintamente na absorção diferencial do teste de Paul-Bunnell-Davidsohn. Este achado contribui para o maior aproveitamento do material biológico disponível (cobaia).

Os índices de concordância entre os testes, obtidos a partir da tabela 4, foram: Paul-Bunnell e hemolisina de boi — 76,9%; Paul-Bunnell e teste de lágrima — 65,0%; hemolisina de boi e teste de lágrima — 64,3%. Estes baixos índices ressaltam a importância da utilização de mais de um dos testes sorológicos, para aumentar a confiabilidade da pesquisa de anticorpos heterófilos no diagnóstico da mononucleose infecciosa.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Clóvis de Araújo Peres, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

VAZ, A.J.; CAMARGO, E.D.; ALDRIGHI, M.L.; SILVA, M.V.; SOUZA, A.M.C. & UEDA, M. — Study on heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):97-102, 1987.

ABSTRACT: Heterophile antibodies, one of the serodiagnostic criteria for Epstein-Barr virus (EBV) infection responsible for infectious mononucleosis (IM) were determined in 143 sera from patients with clinical manifestations of IM which were tested by Paul-Bunnell-Davidsohn (PBD) test, tear drop test (TD) and hemolysin for bovine erythrocytes (HB). An alternative use of guinea-pig liver extract for differential absorption of PBD type antibody was compared with the conventional method employing guinea-pig kidney extract. From the 143 sera, 64 (45%), 80 (56%) and 35 (24%) showed significant titres in PBD, TD and HB tests, respectively. In the differentiation of PBD-antibodies made through absorption with three antigen extracts: guinea-pig kidney (K), guinea-pig liver (L) and bovine red-cell stroma, significant results were observed of 77%, 70% and 58%, respectively. The three tests detect different heterophile antibodies ($p < 0.05$) and the K and L antigens may be employed indistinctively in the differential absorption of heterophile antibodies in the IM ($p < 0.05$). The need of using more than one test for heterophile antibodies detection in IM serodiagnosis is stressed.

DESCRIPTORS: infectious mononucleosis; antibodies, heterophile, in infectious mononucleosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRET, A.M. — The serological diagnosis of glandular fever (infectious mononucleosis): a new technique. *J. Hyg., Cambridge*, 41: 330-43, 1941.
2. BAILEY, G.H. & RAFFEL, S. — Hemolytic antibodies for sheep and ox erythrocytes in infectious mononucleosis. *J. clin. Invest.*, 14:228-44, 1935.
3. BEER, P. — The heterophile antibodies in infectious mononucleosis and after infection of serum. *J. clin. Invest.*, 15:591-97, 1936.
4. DAVIDSOHN, I. — Heterophile antibodies in serum sickness. *J. Immunol.*, 16:259-73, 1929.
5. DAVIDSOHN, I. & RAMSDELL, S.G. — Horse serum as a heterophilic antigen. *J. Immunol.*, 17:365-75, 1929.
6. DAVIDSOHN, I. — Further studies on heterophilic antibodies in serum sickness. *J. Immunol.*, 18:31-49, 1930.
7. DAVIDSOHN, I. — Serological diagnosis of infectious mononucleosis. *J. amer. med. Assoc.*, 108: 289-95, 1937.
8. DAVIDSOHN, I. — Teste for infectious mononucleosis. *Am. J. clin. Pathol.* (tech. suppl.), 2:56-60, 1938.
9. DAVIDSOHN, I.; STERN, K. & KASHIWAGI, C. — Differential test for infectious mononucleosis. *Am. J. clin. pathol.*, 21:1101-13, 1951.
10. DAVIDSOHN, I. & LEE, C.L. — Serological diagnosis of infectious mononucleosis: I. Comparative study of five tests. *Am. J. clin. pathol.* 41:115-25, 1964.
11. DAVIDSOHN, R.J.L. — New slide test for infectious mononucleosis. *J. clin. Invest.*, 20:643-46, 1967.
12. EVANS, A.S.; NIEDERMAN, J.C.; CENABRE, L.C.; WEST, B. & RICHARDS, V.A. — A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr Virus specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis: specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *J. infect. Dis.*, 132:546-54, 1975.
13. HOFF, G. & BAUER, S. — A new rapid slide test for infectious mononucleosis. *J. am. med. Assoc.*, 194:351-53, 1965.
14. LEE, C.L.; DAVIDSOHN, I. & PANCZSZYN, O. — Horse agglutinins in infectious mononucleosis. II. The spot test. *Am. J. clin. Pathol.*, 49:12-18, 1968.
15. MASON, J.K. — An ox cell hemolysin test for the diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Hyg., Cambridge*, 49:471-81, 1951.
16. PAUL, J.R. & BUNNELL, W.W. — The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. med. Sci.*, 183:90-104, 1932.
17. SIEGEL, S. — *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*, Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1975. 350 p.
18. STUART, C.A.; GRIFFIN, A.M.; WHEELER, K.M. & BATTEY, S. — A thermostable antigen in beef cells. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 34:212-15, 1936.

Recebido para publicação em 17 de novembro de 1987.

ENTEROBACTÉRIAS DOS GÊNEROS *KLEBSIELLA*, *ENTEROBACTER* E *SERRATIA* ISOLADAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO*

Ilka Maria LANDGRAF**
Tânia Maria Ibelli VAZ**
Kinue IRINO**
Maria de Fátima Paiva VIEIRA**
Carmo Eliás Andrade MELLES**

RIALA6/633

LANDGRAF, I.M.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; VIEIRA, M.F.P. & MELLES, C.E.A. — Enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* isoladas de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 103-107, 1987.

RESUMO: Enterobactérias isoladas de líquido cefalorraquidiano de 306 pacientes com suspeita de meningite, sendo 131 cepas de *Klebsiella*, 122 de *Serratia*, e 53 de *Enterobacter*, foram estudadas. Relacionando as bactérias isoladas com a faixa etária dos pacientes, foi verificada a predominância de *Klebsiella* e *Serratia* na faixa etária de zero a um ano, e de *Enterobacter* nas faixas etárias acima de um ano. Foram realizadas provas de sensibilidade a 14 antimicrobianos. Quando relacionado o comportamento das cepas isoladas frente a grupos de antimicrobianos, foi observado que as cepas de *Klebsiella* e *Serratia* apresentavam resistência a maior número dos antimicrobianos testados, notadamente frente aos aminoglicosídeos. A resistência a grupos de antibióticos e quimioterápicos foi menor nas cepas de *Enterobacter*. Devido ao perfil variável das cepas do grupo KES estudadas, frente aos antimicrobianos, os autores recomendam que seja sistematizada a caracterização bioquímica destas cepas e realizada a prova de sensibilidade a antimicrobianos para estes agentes, visando, além de informações de ordem terapêutica, colaborar eficazmente na detecção de possíveis infecções nosocomiais.

DESCRITORES: meningite; enterobactérias, resistência a antibióticos e quimioterápicos; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Serratia*.

INTRODUÇÃO

As enterobactérias, embora não sejam os mais freqüentes agentes causais da meningite bacteriana, constituem um grupo de grande importância clínica, por dois fatos principais: responsabilidade nas infecções hospitalares e gravidade da doença que desencadeiam.

O interesse dos pesquisadores no comportamento das enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* (KES) tem se fixado nas bactérias isoladas de urina, secreções das vias respiratórias, sangue e outros exsudatos^{1,13,19}. Alguns autores no estrangeiro que demonstraram interesse nesse grupo de bactérias cultivadas a

partir de líquido cefalorraquidiano, visando principalmente o seu comportamento frente a antibacterianos, apresentaram resultados somente de um ou dois casos, isoladamente^{5,12}. Outros, como FINLAND & BARNES⁹, relataram a presença dessas bactérias em número maior de amostras de líquido cefalorraquidiano, porém, relacionando-as apenas ao índice de mortalidade que representavam para o paciente. Em revisão da literatura especializada, não tivemos informações de estudos semelhantes em nosso país.

O fato de termos isolado e identificado número significativo de bactérias do grupo KES em líquido cefalorraquidiano de pacientes com infecções bacterianas das meninges, levou-nos ao presente

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

trabalho, no qual apresentamos o número de isolamentos e percentagem, a identificação das enterobactérias e a variabilidade de seu perfil de sensibilidade ou resistência aos antibacterianos testados, dados que, no nosso entender, oferecem interesse clínico-epidemiológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas, a partir de 25.374 amostras de líquido cefalorraquidiano purulento, 306 cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, provenientes de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana. Os materiais (LCR) eram procedentes de diversos hospitais da rede estadual de São Paulo, sendo que a maioria foi do Hospital "Emílio Ribas". Todos os materiais foram enviados ao laboratório de Bacteriologia do Instituto "Adolfo Lutz".

As técnicas bacteriológicas utilizadas para o isolamento dessas bactérias constam no manual de "Normas Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas", do Ministério da Saúde³. Resumidamente, consistem na sementeira em meio seletivo para enterobactérias (Mac Conkey) e no repique de colônias isoladas para um meio presuntivo de identificação (Pessoa & Silva).

A determinação das espécies bacterianas foi feita através do estudo do comportamento bioquímico de cada cepa em cultura pura, tendo sido antes observada sua fisiologia geral, ou seja, presença de bacilos Gram-negativos pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*, isto é, aeróbio-anaeróbios facultativos, com oxidase negativa, catalase positiva, fermentadores de glicose com ou sem produção de gás, imóveis ou móveis por flagelos peritriquios, reduzindo nitrato a nitrito e crescendo em meios comuns de cultura.

O tipo de fermentação utilizado pela bactéria foi evidenciado pelas reações de Voges-Proskauer (VP) e vermelho de metila (VM), utilizando-se o meio de Clarck & Lubs para se pesquisar a acetoina (VP) e medir grosseiramente o pH (VM).

A fermentação dos açúcares foi verificada utilizando-se um meio base, água peptonada com indicador de pH, azul de bromotimol, ao qual foi acrescentada solução de cada açúcar, dando uma concentração final de 0,5 a 1%. Os açúcares utilizados foram: adonitol, arabinose, glicerol, inositol, maltose, manitol, melibiose, rafinose, ramnose, sacarose, sorbitol e sorbose. No tubo contendo água peptonada com glicose foi introduzido o tubo de Durham e verificada a produção de gás.

Outras provas foram realizadas para caracterização das cepas:

- a) Estudo do metabolismo de substâncias nitrogenadas, onde foi observada a descarboxilase da lisina, ornitina e arginina; do metabolismo do triptofano, através da triptofanase (produção de indol) e da triptofano-desaminase; e estudo da produção de urease.
- b) Verificação do crescimento das bactérias pela utilização de sais de ácidos orgânicos, como citrato de sódio (Simmons) e malonato de sódio.
- c) Pesquisa das enzimas extracelulares: gelatinase, pela técnica de Frazier, hidrólise do Tween 80, lecitinase e DNase^{4,6,11}.

A prova da sensibilidade ou resistência *in vitro* aos antimicrobianos foi realizada de acordo com a técnica de BAUER et alii², utilizando-se os seguintes antibióticos e quimioterápicos nas respectivas concentrações: ácido nalidíxico, 30 µg; amicacina, 30 µg; ampicilina, 10 µg; canamicina, 30 µg; cefalotina, 30 µg; cefoxitina, 30 µg; colistina, 10 µg, cloranfenicol, 30 µg; estreptomina, 10 µg; fosfomicina, 50 µg; gentamicina, 10 µg; netilmicina, 30 µg; sulfametoxazol/trimetoprina, 25 µg; tetraciclina, 30 µg.

RESULTADOS

Das 306 cepas de enterobactérias isoladas de líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite purulenta, foram identificadas 131 (42,8%) cepas de *Klebsiella*, 122 (39,8%) de *Serratia* e 53 (17,3%) de *Enterobacter*. Das 131 cepas de *Klebsiella*, 129 foram caracterizadas como *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, e 2 como *K. oxytoca*. As cepas de *Serratia* foram todas identificadas como *S. marcescens*. Das de *Enterobacter*, 49 eram *E. cloacae*, 3 eram *E. aerogenes* e 1 era *E. agglomerans* b, grupo 2.

Verificamos que 161 (63,6%) dos 253 pacientes com meningite purulenta em que foi identificada a *Klebsiella* ou *Serratia* eram crianças menores de um ano. Em 36 (67,9%) dos 53 casos em que o agente etiológico foi identificado como *Enterobacter*, os pacientes estavam nas faixas etárias acima de um ano (tab. 1).

Em relação aos resultados das provas de sensibilidade aos antibacterianos testados, observamos que as cepas de *Serratia* apresentaram resistência a maior número de antibacterianos (tab. 2).

TABELA 1

Relação entre enterobactérias do grupo KES isoladas de líquido cefalorraquidiano e faixa etária

Faixa etária meses	<i>Klebsiella</i>		<i>Serratia</i>		<i>Enterobacter</i>	
	nº	%	nº	%	nº	%
0 - 12	78	59,54	83	68,03	17	32,08
> 12	27	20,61	24	19,67	34	64,15
i.d.	26	19,85	15	12,30	2	3,77
Total	131	—	122	—	53	—

i.d. = idade desconhecida.

TABELA 2

Resistência das enterobactérias do grupo KES, isoladas de líquido cefalorraquidiano, aos antibióticos e quimioterápicos testados

Antibióticos e quimioterápicos	Cepas testadas								
	<i>Klebsiella</i>			<i>Enterobacter</i>			<i>Serratia</i>		
	Nº	resistentes		Nº	resistentes		Nº	resistentes	
		nº	%		nº	%		nº	%
Ácido nalidíxico	131	9	6,87	53	3	5,66	122	2	1,64
Amicacina	131	57	43,51	53	3	5,66	50	9	18,00
Ampicilina	131	125	95,42	53	47	88,68	122	122	100,00
Canamicina	131	92	70,23	53	11	20,75	122	106	86,89
Cefalotina	131	87	66,41	53	52	98,11	122	121	99,18
Cefoxitina	131	4	3,05	21	21	100,00	24	10	41,67
Colistina	131	17	12,98	53	6	11,32	122	92	75,41
Cloranfenicol	131	97	74,04	53	15	28,30	122	91	74,59
Estreptomicina	131	95	72,62	53	21	39,62	122	103	84,43
Fosfomicina	122	122	100,00	29	25	86,21	29	15	51,72
Gentamicina	131	86	65,65	53	5	9,43	122	85	69,67
Netilmicina	63	49	77,78	23	3	13,04	28	17	60,71
Sulfametoxazol- -trimetoprina	54	47	87,04	21	19	90,48	27	23	85,19
Tetraciclina	131	90	68,70	53	39	73,58	122	111	90,98

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No período de 1974 a 1985, foi possível diagnosticar laboratorialmente 25.374 casos de meningite bacteriana, dentre as 66.803 amostras de líquido cefalorraquidiano analisadas na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. Naquelas

amostras, foram identificadas 24.795 bactérias e, destas, 1.234 (4,98%) eram enterobactérias. Entre estas enterobactérias, as do grupo KES corresponderam a 393 (31,84%) cepas, mas foram estudadas 306.

Segundo nossos resultados, consideramos de

grande interesse clínico-epidemiológico o fato de encontrarmos maior ocorrência de *Enterobacter* em pacientes de faixa etária acima de um ano, ao contrário do que ocorre na maioria das meningites bacterianas. Esta observação leva à suposição de que estas infecções não tenham tido origem hospitalar, fato que é reforçado, ainda, por mostrarem estas cepas menor resistência ou maior sensibilidade aos antibacterianos.

As infecções por *Klebsiella* e *Serratia* ocorreram predominantemente na faixa etária inferior a um ano, caracterizando-se estas bactérias, na sua maioria, por multirresistência aos quimioterápicos e antibióticos empregados.

Vários pesquisadores⁷ observaram, com relação ao grupo KES, que o uso de determinado antibiótico pode promover a seleção das cepas a ele resistentes, e FINLAND⁶ descreve a evolução da resistência de cepas de *Klebsiella* e *Serratia* à gentamicina.

MACARTHUR & ACKERMAN¹² estudaram cepas de *Serratia* isoladas de vários materiais, segundo a patologia da infecção, dos quais 2 eram líquido cefalorraquidiano, e encontraram cerca de 32% de cepas resistentes aos antibióticos por eles testados. Estes autores também observaram diferentes padrões de sensibilidade antimicrobiana em diversos isolados da mesma bactéria, obtidos de uma mesma pessoa.

No nosso estudo, observamos que, em uma cepa de *S. marcescens* isolada em dias sucessivos do mesmo paciente, houve variação do perfil de sensibilidade antimicrobiana, pois a mesma cepa que fora sensível à estreptomomicina, canamicina, cloranfenicol e gentamicina tornou-se resistente a estes mesmos antibióticos, quando da segunda cultura.

Considerando-se os grupamentos de antibióticos, segundo sua estrutura química, ficou evidente a resistência acentuada aos aminoglicosídeos das cepas de *Klebsiella* e de *Serratia*, com exceção da amicacina. Esta resistência não ocorreu quando se tratava de cepas de *Enterobacter*. No entanto, em relação a este último gênero, houve resistência quase total às cefalosporinas testadas, o que outros autores já haviam observado^{5, 7}. Resistência semelhante à ampicilina foi verificada nos três gêneros de bactérias por nós estudadas.

Como já foi observado por outros autores^{7, 11}, o ácido nalidixico é antibacteriano muito ativo contra enterobactérias do grupo KES. Por este motivo, incluímos em nosso estudo a observação da ação deste quimioterápico, muito embora ele não tenha indicação clínica para combater estas bactérias sediadas no líquido cefalorraquidiano. Analisando os resultados por nós obtidos (tab. 2), verificamos que este antibiótico se mostrou eficaz para os três gêneros estudados.

O cloranfenicol, que é antibiótico muito difundido na prática terapêutica, mostrou ação moderada nas cepas de *Enterobacter*, enquanto que nas cepas de *Klebsiella* e *Serratia* ele foi pouco eficaz, em virtude da resistência acentuada que estas bactérias apresentam.

Embora o grupo KES seja um agente etiológico pouco freqüente^{10, 15, 16}, pode-se, através de sua detecção, surpreender pequenos surtos de meningite infecciosa originados por infecção hospitalar.

A caracterização bioquímica destes agentes bacterianos e o estudo da resistência aos antibacterianos, geralmente apresentando um perfil amplo de resistência, se sistematizados, virão colaborar eficazmente na detecção de possíveis infecções nosocomiais.

RIALA6/633

LANDGRAF, I.M.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; VIEIRA, M.F.P. & MELLES, C.E.A. — Enterobacteria of genera *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* isolated from cerebrospinal fluid. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):103-107, 1987.

ABSTRACT: The enterobacteria isolated from the cerebrospinal fluid of 306 patients suspected of meningitis included 131 strains of *Klebsiella*, 122 of *Serratia* and 53 of *Enterobacter*. *Klebsiella* and *Serratia* strains were more frequently isolated from the spinal fluid of children less than one year old while *Enterobacter* strains were isolated from older children. *Klebsiella* and *Serratia* strains were resistant to a greater number of antibiotics, particularly to those of the aminoglycoside group than *Enterobacter* strains.

DESCRIPTORS: meningitis; drug resistance, bacterial; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Serratia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATKINSON, B.A. & LORIAN, V. — Antimicrobial agents susceptibility patterns of bacteria in hospitals from 1971 to 1982. *J. clin. Microbiol.*, 20:791-6, 1984.
2. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, F.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. clin. Pathol.*, 45:493-6, 1966.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública — Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1986. 49 p. (Série A: Normas e manuais técnicos, 32).
4. BRENNER, D.J. — Family I. *Enterobacteriaceae*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, c1984. v. 1, p.408-516.
5. DANS, P.E.; BARRET, F.F.; CASEY, J.I. & FINLAND, M. — *Klebsiella-Enterobacter* at Boston City Hospital, 1967. *Arch. intern. Med.*, 125:94-101, 1970.
6. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — *Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed New York, Elsevier, 1986. 583 p.
7. FINLAND, M. — Emergence of antibiotic resistance in Hospitals, 1935-1975. *Rev. infect. Dis.*, 1:4-21, 1979.
8. FINLAND, M. — Nosocomial epidemics seriatim. *Arch. intern. Med.*, 137:585-7, 1977.
9. FINLAND, M. & BARNES, M.W. — Acute bacterial meningitis at Boston City Hospital during 12 selected years — 1935-1972. *J. infect. Dis.*, 136:400-15, 1977.
10. GRABER, C.D.; HIGGINS, L.S. & DAVIS, J.S. — Seldom-encountered agents of bacterial meningitis. *J. Am. med. Assoc.*, 192:956-60, 1965.
11. GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; ROSNAY, D.H.L.C. & SNEATH, P.H.A. — Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. gen. Microbiol.*, 98:39-66, 1977.
12. MACARTHUR, B.S. & ACKERMAN, N.N.B. — The significance of *Serratia* as an infectious organism. *Surg. Gynecol. Obstetr.*, 146:49-53, 1978.
13. NICOLELIS, M.A.L.; MARTINS, M.A.; MEIRELLES, L.P. & BIROLINI, D. — Análise dos padrões de incidência e sensibilidade bacteriana em uma unidade cirúrgica com o uso de microcomputador. *Rev. Assoc. méd. bras.*, 32: 134-40, 1986.
14. SANFORD, J.P. — Sensitivity tests of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J. infect. Dis.*, 119:388-90, 1969.
15. SHEDDEN, W.I. — Meningitis due to *Serratia marcescens*. *Arch. Dis. Child.*, 38:87, 1963.
16. THOMPSON, J.L. — Meningitis caused by *Bacillus prodigiosus* — report of a case. *Med. Ann. D.C.*, 12:145-6, 1943.
17. THORNTON, G.F. & ANDRIOLE, V.T. — Antibiotic sensitivities of non-pigmented *Serratia marcescens* to gentamicin and carbenicillin. *J. infect. Dis.*, 119:393-4, 1969.
18. WATANABE, T. — Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, 27:87-115, 1963.
19. WILFERT, J.N.; BARRET, F.F.; EWING, W.H.; FINLAND, M. & KASS, E.H. — *Serratia marcescens*: biochemical, serological and epidemiological characteristics and antibiotic susceptibility of strains isolated at Boston City Hospital. *Appl. Microbiol.*, 19:345-52, 1970.

Recebido para publicação em 4 de janeiro de 1988.

SOROGRUPOS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA ISOLADA DE COPROCULTURAS, NO PERÍODO DE 1983 A 1987, NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO*

Ângela Maria Girardi DIAS**
Glória Regina Freitas do VALLE**
Maria Aidê Mitico Fukushima KATO**
Lêda Kano NAKAHARA**
Elena KANO**

RIALA6/634

DIAS, A.M.G.; VALLE, G.R.F.; KATO, M.A.M.F.; NAKAHARA, L.K. & KANO, E. — Sorogrupos de *Escherichia coli* enterotoxigênica isolada de coproculturas, no período de 1983 a 1987, no Município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):109-113, 1987.

RESUMO: Durante o quinquênio 1983-1987 foram isoladas, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, 87 cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica, a partir de 5.629 coproculturas. A média percentual de positividade nestes 5 anos foi de 1,54%. Entre as 87 cepas produtoras de toxina termoestável, 31 (35,63%) produziram também toxina termolábil, com relação ao antígeno fator de colonização I e II (antígeno fimbriado F2 e F3), 43 (49,43%) cepas apresentaram um desses fatores. A utilização de 33 soros somáticos permitiu a identificação sorológica de 61 (70,11%) das 87 cepas estudadas. Os sorogrupos 0:6, 0:153, 0:78, 0:27 e 0:139 foram os mais frequentes.

DESCRITORES: *Escherichia coli* enterotoxigênica, sorogrupos; infecções por *Escherichia coli*, ocorrência; diarreia.

INTRODUÇÃO

A partir de 1967, trabalhos de vários pesquisadores^{2,8,18,20} confirmaram a existência das toxinas termolábil e termoestável em filtrados estéreis, preparados a partir de cultura de *E. coli*.

Atualmente, a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) constitui uma das principais causas da diarreia infantil, principalmente em países subdesenvolvidos, onde cada criança pode apresentar anualmente, de 2 a 3 episódios de diarreia, associados a ETEC¹¹.

A *E. coli* enterotoxigênica coloniza o intestino delgado e produz as enterotoxinas. As cepas de ETEC aderem aos enterócitos do intestino humano através de antígenos fatores de colonização, codificados por plasmídios. Os antígenos fatores de colonização (CFA) mais frequentemente iden-

tificados nas cepas de *E. coli* de origem humana são o CFA/I e CFA/II (antígeno fimbriado F2 e F3)¹⁴, originalmente descritos por EVANS & EVANS³, entretanto novos fatores de colonização são atualmente conhecidos^{1, 12, 14}. As enterotoxinas termolábeis e/ou termoestáveis, também codificadas por plasmídios, podem ser produzidas simultânea ou isoladamente, dependendo da cepa.

Considerando que as cepas de ETEC pertencem a um número restrito de sorogrupos usualmente diferentes dos outros sorogrupos de *E. coli* enteropatógena, a identificação sorológica poderia ser uma alternativa para o diagnóstico de infecções causadas por este grupo de *E. coli*.

Neste trabalho foram determinados os sorogrupos de *E. coli* enterotoxigênica produtores de toxinas termoestável metanol solúvel e/ou termolábil,

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

** do Instituto Adolfo Lutz.

isoladas de coproculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

As 87 cepas de *E. coli* enterotoxigênica foram isoladas de 5.629 coproculturas, realizadas no período de 1983 a 1987, no Instituto Adolfo Lutz, de pacientes internados em hospitais, ou encaminhados pelos centros de Saúde do Município de São Paulo.

O isolamento das enterobactérias foi feito segundo a metodologia descrita por PESSOA et alii^{15, 16}. A identificação bioquímica de *E. coli* e de outras enterobactérias patogênicas foi realizada segundo os métodos descritos por EDWARD & EWING⁴.

A produção da enterotoxina termoestável metanol solúvel (STa) foi detectada através do teste de DEAN². Para a detecção da enterotoxina termolábil (LT) foi utilizado o método de imune-hemólise radial em gel de agarose^{10, 19}, e os CFA/I e CFA/II foram determinados através da aglutinação em lâmina, utilizando soros específicos.

Os 33 soros somáticos 0:6, 0:8, 0:9, 0:11, 0:15, 0:20, 0:21, 0:25, 0:27, 0:43, 0:44, 0:45, 0:50, 0:51, 0:53, 0:62, 0:63, 0:73, 0:78, 0:85, 0:101, 0:113, 0:114, 0:115, 0:128, 0:139, 0:148, 0:149, 0:151, 0:153, 0:157, 0:159 e 0:167 foram produzidos segundo a metodologia descrita por Kauffmann⁴. Os soros específicos, quando necessário, foram absorvidos. A identificação dos sorogrupos das 87 cepas estudadas foi realizada através da aglutinação, segundo a técnica descrita por gross & ROWE⁶.

RESULTADOS

As características das 87 cepas de *E. coli* enterotoxigênica isoladas no quinquênio 1983-1987 estão na tabela 1, onde temos a distribuição do número de cepas em relação ao tipo de enterotoxina produzida, os tipos de fator de colonização e os sorogrupos mais freqüentes.

Na tabela 2 temos a distribuição, por faixa etária, dos sorogrupos de *E. coli* enterotoxigênica.

Na tabela 3 estão relacionados o número e o percentual anual de *E. coli* enterotoxigênica, em relação ao número de coproculturas realizadas.

TABELA 1

Distribuição de sorogrupos de *Escherichia coli* enterotoxigênica e sua associação com os fatores de colonização

Sorogrupo	Enterotoxina termoestável			Enterotoxinas termoestável e termolábil			Cepas	
	CFA/I	CFA/II	ND*	CFA/I	CFA/II	ND*	Nº	%
0:6	—	1	—	—	11	6	18	20,69
0:27	—	—	4	—	—	1	5	5,74
0:78	12	—	1	2	—	—	15	17,24
0:128	1	—	—	—	—	—	1	1,15
0:139	—	—	—	—	—	2	2	2,30
0:153	13	—	3	—	—	—	16	18,39
0:159	—	—	1	—	—	3	4	4,60
0**	3	—	17	—	—	6	26	29,89
Total	29	1	26	2	11	18	87	100,00

* ND — Fator de colonização não determinado.

** O — Sorogrupo não determinado.

TABELA 2

Distribuição por faixa etária dos sorogrupos de *Escherichia coli* enterotoxigênica isolados no período de 1983 a 1987

Sorogrupos	Cepas							Total
	Faixa etária							
	0 - 3m	3 - 6m	6 - 12m	1 - 5a	5 - 10a	>10a	i.d.	
0:6	1	1	2	9	2	2	1	18
0:27	—	—	2	1	—	1	1	5
0:78	1	1	4	6	—	2	1	15
0:128	1	—	—	—	—	—	—	1
0:139	—	—	—	1	—	—	1	2
0:153	4	4	4	4	—	—	—	16
0:159	—	—	—	3	—	1	—	4
0*	4	4	1	10	—	4	3	26
Total (%)	11 (12,64)	10 (11,50)	13 (14,94)	34 (39,08)	2 (2,30)	10 (11,50)	7 (8,04)	87 (100,00)

m — meses.

a — anos.

i.d. — idade desconhecida.

0* — sorogrupo não determinado.

DISCUSSÃO

TABELA 3

Número e percentual anual de *Escherichia coli* produtora da toxina termoestável

Ano	Coproculturas	Cepas de <i>E. coli</i> enterotoxigênica termoestável	
		Nº	%
1983	1.371	19	1,38
1984	1.168	23	1,96
1985	1.320	21	1,59
1986	1.014	16	1,57
1987	756	08	1,05
Total	5.629	87	—

Neste estudo correspondente ao período de 1983 a 1987, verificamos que o percentual médio de positividade de *E. coli* enterotoxigênica foi de 1,54%, sugerindo uma significativa incidência destes enteropatógenos nestes últimos anos. Dentre as 87 cepas de ETEC produtoras de toxina termoestável (STa), 31 (35,63%) produziram também a toxina termolábil (LT). Em relação aos fatores de colonização, 43 (49,43%) produziram CFA/I ou CFA/II, sendo 31 (72,09%) produtoras de CFA/I e 12 (27,91%) de CFA/II.

A utilização de 33 soros somáticos permitiu a identificação sorológica de 70,11% das 87 cepas estudadas. Os sorogrupos mais frequentes foram 0:6, 0:153, 0:78, 0:27, 0:159, e 0:139; sorogrupos como 0:128 e 0:63, que anteriormente eram encontrados no nosso meio^{7,9}, hoje são pouco isolados, tendo sido substituídos por outros sorogrupos como 0:153 e 0:159.

Os sorogrupos 0:6, 0:78 e 0:153 foram os mais frequentes, sendo que a quase totalidade das cepas pertencentes a estes sorogrupos produziram os fatores CFA/I ou CFA/II, enquanto que as cepas pertencentes aos sorogrupos 0:27, 0:139 e 0:159 não produziram nenhum destes fatores.

Em relação à produção de LT, os sorogrupos 0:6, 0:139 e 0:159 apresentaram um índice elevado de positividade: 17 das 18 cepas pertencentes ao sorogrupo 0:6 produtoras de STa produziram também LT; 2 cepas do sorogrupo 0:139 produtoras de STa também eram produtoras de LT; das 4 cepas do sorogrupo 0:159, 3 eram capazes de produzir LT. Das 15 cepas do sorogrupo 0:78, apenas 2 produziram LT e, no sorogrupo 0:27, 1 entre as 5 cepas foi capaz de produzir LT. Das 26 cepas pertencentes aos sorogrupos ainda não identificados, 20 produziram somente STa, 3 produziram

STa e CFA/I e 6 cepas produziram simultaneamente STa e LT.

A *E. coli* enterotoxigênica parece pertencer a um número limitado de sorogrupos e, assim, a identificação sorológica poderia ser um método de diagnóstico; entretanto, dada as oscilações de sorogrupos que podem ocorrer em uma determinada região^{3,7,13,17}, os testes de detecção de enterotoxinas, principalmente de STa, produzidas pela maioria das cepas enterotoxigênicas, constituem ainda os métodos preferidos de identificação destes patógenos. Em áreas tropicais a ETEC é uma importante causa da diarreia, podendo atingir pacientes de qualquer faixa etária. Entretanto, neste estudo verificamos que aproximadamente 80% das cepas foram isoladas de crianças na faixa etária de 0 a 5 anos que, em nosso meio, sempre constitui a faixa etária mais atingida também por outras bactérias enteropatógenicas⁹.

RIALA6/634

DIAS, A.M.G.; VALLE, G.R.F.; KATO, M.A.M.F.; NAKAHARA, L.K. & KANO, E. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroups in isolates from stool cultures made from 1983 to 1987 in the Municipality of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):109-113, 1987.

ABSTRACT: During the period 1983-1987, 87 enterotoxigenic strains *Escherichia coli* were positive for the colonization factor antigen I or II (fimbrial antigen F2, F3). With 33 positive stool cultures during the five-period. Among the 87 thermostable toxin-producing strains, 31 (35.6%) were also thermolabile toxin-producing strains, while 43 strains (49.4%) were positive for the colonization factor antigen I or II (fimbrial antigen F2, F3). With 33 somatic antisera, 61 (70.1%) of the strains were identified and the most frequent serogroups were 0:6, 0:153, 0:78, 0:159, 0:27 and 0:139.

DESCRIPTORS: *Escherichia coli*, enterotoxigenic, serogroups; *Escherichia coli* infections, occurrence; diarrhea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DARFEVILLE-MICHAUD, A.; FORESTIER, C.; MASSEBOEUF, R.; RICH, C.; BOUP, S.M.; JOLY, B. & DENIS, F. — Multiplicity of serogroups and adhesins in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from acute diarrhea in Senegal. *J. clin. Microbiol.*, 25:1048-51, 1987.
2. DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. HARDEN, L.B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. infect. Dis.*, 125:407-11, 1972.
3. DEBOY II, J.M.; WACHSMUTH, I.K.; & DAVIS, B.R. — Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect. Immunol.*, 29:361-8, 1980.
4. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York, Elsevier, 1986. 536 p.
5. EVANS, D.J., Jr. & EVANS, D.G. — Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factor, with special reference to colonization factor antigens. *Rev. infect. Dis.*, 5:692-701, 1983.
6. GROSS, R.J. & ROWE, B. — *Escherichia coli* diarrhoea. *J. Hyg., Camb.*, 95:531-50, 1985.

DIAS, A.M.G.; VALLE, G.R.F.; KATO, M.A.M.F.; NAKAHARA, L.K. & KANO, E. — Sorogrupos de *Escherichia coli* enterotoxigênica isolada de coproculturas, no período de 1983 a 1987, no Município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):109-113, 1987.

7. GUTH, B.E.C. & TRABULSI, L.R. — Evaluation of antisera used for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* in São Paulo. *J. clin. Microbiol.*, 22:626-8, 1985.
8. GYLES, C.L. & BARNUM, D.A. — A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J. infect. Dis.*, 120: 419-26, 1969.
9. IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período de 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-78, 1984.
10. LEONARDO, M.B. — Avaliação da técnica de imunohemólise radial para a identificação de *Escherichia coli* produtora de enterotoxina termolábil (LT). Campinas, 1981. 65p. [Dissertação de mestrado — Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP].
11. LEVINE, M.M. — *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and entero-adherent. *J. infect. Dis.*, 155:377-89, 1987.
12. McCONNEL, M.M.; THOMAS, L.V.; SCOTLAND, S.M.; & ROWE, B. — The possession of coli surface antigen CS6 by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 025, 027, 0148 and 0159: a possible colonization factor? *Curr. Microbiol.*, 14:51-4, 1986.
13. ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; EVANS, D.J., Jr.; SACK, R.B.; SACK, D.A. & WADSTROM, T. — Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.* 162:73-80, 1976.
14. ORSKOV, F. — Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941^{AL}. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. — *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, c1984. v. 1, p. 421.
15. PESSÔA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T.; MELLES, C.E.A. & KANO, E. — Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. I. Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:87-105, 1978.
16. PESSÔA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. — Milieu pour l'identification présumptive rapide des entérobactéries, des aeromonas et des vibrions. *Ann. Microbiol.*, Paris, 125A:341-7, 1974.
17. REIS, M.H.L.; MATOS, D.P.; CASTRO, A.F.P.; TOLEDO, R.F. & TRABULSI, L.R. — Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes, and sources of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immunol.*, 28:24-7, 1980.
18. SACK, R.B.; GORBACH, S.L.; BANWELL, J.G.; JACOBS, B.; CHATTERJEE, B.D. & MITRA, R.C. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholerae-like disease. *J. infect. Dis.*, 123: 378-85, 1971.
19. SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P.; LEONARDO, M.B. & MONTEIRO, A.R. — Single radial immune hemolysis test for detection of *Escherichia coli* thermolabile enterotoxin. *J. clin. Microbiol.* 14:473-8, 1981.
20. SMITH, H.W. & HALLS, S. — Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.*, 93:531-43, 1967.

Recebido para publicação em 5 de janeiro de 1988.

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

- ALDRIGUI, M.L., 97
ALGE, M.E., 11
AUED, S., 5
AURICCHIO, M.T., 39
BACETTI, L.B., 5
BADOLATO, E.S.G., 87
BARRETTO, H.H.C., 19
BATISTIC, M.A., 39
BRANDILEONE, M.C.C., 31
CAMARGO, E.D., 97
CARVALHO, J.B., 5
CAVALIERE, M.J., 45
COSTA, I.B., 59
CRUZ, A.S., 51
CUPPOLONI, K.M., 51
DIAS, A.M.G., 109
FERRAZOLI, L., 11
FUZIHARA, T.O., 11
GOMES, L.F.S., 51
GOMES, M.R.O.M., 59
HEREDIA, R., 65
HOPPEN, V.R., 39
INOMATA, O.N.K., 19
IRINO, K., 103
KANO, E., 109
KATO, M.A.M.F., 109
KISELIUS, J., 77
LAMARDO, L.C.A., 87
LANDGRAF, I.M., 103
LARA, W.H., 19
LAZAROTTI, D.S., 77
LOBANCO, C.M., 1
MAEDA, M.Y.S., 45
MAIO, F.D., 87
MARQUES, C.C.A., 59
MARQUES, G.R.A.M., 59
MARTINEZ, C.H.O., 51
MARTINS, M.C.B., 1
MARTINS, M.S., 65
MELLES, C.E.A., 31, 103
MIRANDA, J.B., 11
NAKAHARA, L.K., 109
OLIVEIRA, J.J.V., 25
PALACI, M., 11
PEDRO, N.A.R., 25
PENNACINO, M.R., 1
PEREIRA, H.G., 77
RAMOS, S.R., 31
SACCHI, C.T., 31
SALLES GOMES, L.F.,
veja GOMES, L.F.S.
SANTOS, L., 59
SHIH, L.W.S., 45
SILVA, E.A.M., 11
SILVA, M.V., 97
SILVA, R.R.F., 11
SOUZA, A.M.C., 97
TAKAHASHI, M.Y., 5, 65
TAUNAY, A.E., 31
TAVARES, M., 1, 5
TIMENETSKY, M.C.S.T., 77
TONDELLA, M.L.C., 31
TRUJILLO, L.M., 1
UEDA, M., 97
VALLE, G.R.F., 109
VALLILO, M.I., 25
VAZ, A.J., 97
VAZ, T.M.I., 103
VIEIRA, M.F.P., 103
YABIKU, H.Y., 65
YAMAMOTO, L.S.U., 45
ZANELATTO, A.M., 5
ZENEON, O., 25, 65, 87

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Ácido benzóico
em sucos naturais de frutas, determinação, 65
- Ácidos graxos
em óleos naturais, determinação
cromatografia em fase gasosa, 87
- Adenovírus, 77
- Água natural
nitrato em, determinação, 25
- Alimentos
fraudes em, detecção, 1
- Anticorpos heterófilos
na mononucleose infecciosa, 97
- Biomphalaria straminea*, 59
- Biomphalaria tenagophila*, 59
- Cafeína
em guaraná (*Paullinia cupana*), determinação, 39
- Carne bovina (crua), análise
sais de sulfito em, detecção, 1
- Carne, conservas
nitratos, nitritos em, determinação, 5
- Chlamydia trachomatis*, 45
- Conservas de carne, 5
- Corynebacterium diphtheriae*, biotipos, 31
- Culturas celulares, 51
- Doenças do colo uterino, 45
- Diarréia, 109
- Diarréia infantil, 77
- Dióxido de enxofre
em sucos naturais de frutas, determinação, 65
- Esfregaços vaginais, 45
- Escherichia coli* enterotoxigênica,
sorogrupos, 109
- Esquistossomose mansônica, 59
- Genoma viral, 77
- Guaraná (*Paullinia cupana*)
cafeína em, determinação
espectrofotometria, 39
- Infecção por adenovírus, 77
- Infecção por *Escherichia coli*, ocorrência,
Município de São Paulo, 109
- Infecção por rotavírus, 77
- Infecção pulmonar por *Mycobacteria kansasii*,
ocorrência
São Paulo, Brasil, 11
- Infecções por micobactérias, 11
- Klebsiella*, 103
- Materiais biocompatíveis
teste de toxicidade, 51
- Meningite, 103
- Mononucleose infecciosa, 97
- Muco cervical
citopatologia, 45
- Mycobacterium kansasii*, 11
- Nitratos
em água natural
estudo comparativo de métodos de
determinação, 25
em conservas de carne, determinação, 5
- Nitritos
em conservas de carne, determinação, 5
- Óleos naturais
ácidos graxos em, determinação, 87
fraudes, detecção, 87
vitaminas em, determinação, 87
- Pesticidas organoclorados, resíduos
em soro sanguíneo humano, detecção
cromatografia em fase gasosa, 19
- Resíduos de pesticidas organoclorados, 19
- Resistência a antibacterianos, 103
- RNA viral, 77
- Rotavírus, 77
- Sais de sulfito
em carne bovina, detecção, 1
- Schistosoma mansoni*, 59
- Serratia*, 103
- Sucos naturais de frutas
ácido benzóico em, determinação, 65
dióxido de enxofre em, determinação, 65
- Vitaminas
em óleos naturais, determinação
cromatografia em fase gasosa, 87

SUBJECT INDEX

- Adenovirus, 77
Adenovirus infections, 77
Antibodies, heterophile
 in infectious mononucleosis, 97
Benzoic acid
 in fruit juices, natural, determination, 65
Biocompatible materials
 test for toxicity, 51
Biomphalaria straminea, 59
Biomphalaria tenagophila, 59
Caffein
 in guarana (*Paullinia cupana*), determinação, 39
Cells, cultured, 51
Cervix diseases, 45
Cervix mucus
 citopathology, 45
Chlamydia trachomatis, 45
Corynebacterium diphtheriae, biotypes, 31
Diarrhea, 109
Diarrhea, infantile, 77
Drug resistance, bacterial, 103
Escherichia coli, enterotoxigenic serogroups, 109
Escherichia coli infections, occurrence, 109
Fatty acids
 in natural oils, determination
 gas-liquid chromatography, 87
Foods
 frauds in, detection, 1
Fruit juices, natural
 benzoic acid in, determination, 65
 sulphur dioxide in, determination, 65
Genes, viral, 77
Genomes, viral
 see Genes, viral
Guarana (*Paullinia cupana*)
 caffein in, determination
 spectrophotometry, 39
Infectious mononucleosis, 97
Klebsiella, 103
Lung infection
 due to *Micobacterium kansasii*, occurrence
 São Paulo, Brazil, 11
Meat
 beef (raw) analysis, 1
 sulphite salts in, detection, 1
 preserved
 nitrates, nitrites in, determination, 5
Meningitis, 103
Mycobacterium infections, 11
Mycobacterium kansasii, 11
Nitrates
 in natural water
 methods of determination, comparative study, 25
 in preserved meat, determination, 5
Nitrites
 in preserved meat, determination, 5
Oils, natural
 fatty acids in, determination, 87
 fraud detection in, 87
 vitamins in, determination, 87
Organochlorine pesticide residues
 in human blood serum, detection
 gas-liquid chromatography, 19
Pesticides
 organochlorine pesticide residues, 19
Preserved meat
 see Meat, preserved
RNA, viral, 77
Rotavirus, 77
Rotavirus infections, 77
Schistosoma mansoni, 59
Schistosomiasis mansoni, 59
Serratia, 103
Sulphite salts
 in beef (raw), detection, 1
Sulphur dioxide
 in fruit juices, natural, determination, 65
Vaginal smears, 45
Viral genes
 see Genes, viral
Viral genomes
 see Genes, viral
Vitamins
 in natural oils, determination
 gas-liquid chromatography, 87
Water, natural
 nitrate in, determination, 25

*Fotocomposição, Diagramação,
Arte, Fitolito e Impressão
PRODICAFI Gráfica e Editora Ltda.
Fones: 571-3095 e 572-9927*