



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

RIALA 6

VOLUME 49

NÚMERO 1

JUNHO, 1989



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

REDATOR RESPONSÁVEL

LUIZ SEBASTIÃO PRIGENZI
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

ODAIR ZENEBON, *Presidente*
CARMO ELIAS ANDRADE MELLES
ELISEU ALVES WALDMAN
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO
JOSÉ EDUARDO TOLEZANO
JOSÉ LEOPOLDO FERREIRA ANTUNES
MYRNA SABINO
NEUS PASCUET PREGNOLATTO
VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES

REDATOR-SECRETÁRIO

DEBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

EQUIPE TÉCNICA

Revisão de referências bibliográficas:

Alderica Barbosa Mearim Luiz e Mariely Missaglia Moukarzel Sbardelini

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*

(*)

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (Secretaria de Estado da Saúde) São Paulo, SP – Brasil, 1941 –	
1941 - 1988, 1-48	
1989, 49 (1,)	
ISSN 0073-9855 RIALA6	CDD 614.07205 <small>18</small>

(*) 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 Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS, SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

SUMÁRIO / CONTENTS

Editorial

- A vigilância epidemiológica e o laboratório de Saúde Pública 1-4

Artigos

- 651 Caracterização por cromatografia em camada delgada de preparações extrativas de *Allium sativum* L.
Thin-layer chromatography of preparations from Allium sativum
Vânia Rodrigues HOPPEN; Mariangela Tirico AURICCHIO & Mônica Arcon BATISTIC 5-10
- 652 Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia
Comparison of methods for filth in alimentary pastes
Claydes de Quadros ZAMBONI Márcia Bitar ATUI 11-17
- 653 Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo
Evaluation of physicochemical and microbiological quality of pasteurized milk consumed in São Paulo City
Neusa Vitória V. SILVEIRA; Harumi SAKUMA; Marilda DUARTE; Maria Auxiliadora B. RODAS; Jacira H. SARUWTARI & Elizabeth L. CHICOUREL 19-25
- 654 Resíduos tóxicos em cânulas e seringas esterilizadas com óxido de etileno
Toxic residues in cannulae sterilized and syringes reesterilized with ethylene oxide
Maria Helena NOGUEIRA; Maria do Carmo Q. AVELAR; HELOISA H.C. BARRETO & Dilma P.A. CARDOSO 27-34
- 655 Caracterização de banana (*Musa* sp.) em produtos industrializados, por coloração de células de tanino
Differential staining of tannin cells of banana (Musa sp.) in commercial products
Marlene Correia dos SANTOS & Claydes de Quadros ZAMBONI 35-39
- 656 Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987.
Incidence of aflatoxins in peanut and peanut products consumed in São Paulo City, for the period 1980-1987
Myrna SABINO; M. Ângela P. ZORZETTO; Marcelo O. PEDROSO & Thais V. MILANEZ 41-44

657	Verificação da qualidade de chás medicinais <i>Quality and identity of medicinal teas</i> Mônica Arcon BATISTIC; Mariangela Tirico AURICCHIO; Vânia Rodrigues HOPPEN & Isaura Yuriko YAMASHITA	45-49
658	Estudo comparativo de métodos usuais para determinação de arsênio <i>Comparative study of the usual methods for the determination of arsenic</i> Helena Yuco YABIKU; Nelson Aranha DIAS & Maristela Satou MARTINS	51-55
659	Efeitos da esterilização sobre catgutes simples. Estudo comparativo entre radiação do Co60 e soluções químicas <i>Effects of sterilization on simple catguts. Comparative study between radiation of Co60 and chemical solutions</i> Walter ALVES; Otilia Ferreira NOVO; Ileana E.M. FONSECA & Helena Ide ALVES .	57-59
660	Valor da bacterioscopia, cultura e imunoelectroforese cruzada no diagnóstico das meningites bacterianas <i>Bacterioscopy, culture and counterimmunoelectrophoresis (IEC) values in the diagnosis of bacterial meningitis</i> Carmo Elias Andrade MELLES; Ilka Maria LANDGRAF; Maria Lúcia FARACO & Ne-reide Borges BOSCARDIN	61-67
661	Correlação entre giardíase e grupo sanguíneo (Sistema ABO) no Município de São Caetano do Sul, SP <i>Correlation between giardiasis and blood group (ABO System) in the Municipality of São Caetano do Sul, São Paulo State, Brazil</i> Domingas Maria A.G. Vieira TORRES; Maria Isabel de OLIVEIRA; Terume O. FUZIHARA; Rosa Maria Donini Souza DIAS; Ana Célia S. MANGINI; José Leopoldo Ferreira ANTUNES & Fernando M. Azevedo CORRÊA	69-73
662	Patologia da leptospirose. Análise crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a compreensão da patogenia <i>Pathology of leptospirosis. A critical analysis of morphological and immunohistochemical features relevant to pathogenesis of systemic lesion</i> Venâncio Avancini Ferreira ALVES; Sheila Aparecida Coelho SIQUEIRA & Cynthia Bomfim PESTANA	75-80
663	Hortalças comercializadas em São Paulo: aspectos da contaminação por chumbo, cádmio e zinco <i>Fresh vegetables sold in São Paulo: aspects of lead, cadmium and zinc contamination</i> Alice Momoyo SAKUMA; Maria Anita SCORSAFAVA; Odair ZENEON; Paulo TIGLEA & Cláudio Junji FUKUMOTO	81-84
664	Técnicas parasitológicas para investigação de animais naturalmente infectados por flagelados do gênero Trypanosoma Gruby, 1843. <i>Parasitologic technics for investigation of naturally infected animals by flagellates of genus Trypanosoma Gruby, 1843</i> José Eduardo TOLEZANO; Elizabeth Visone NUNES; Osvaldo Martinez D' ANDRADE; Maria de Fátima Lereno de ARAUJO; José Mario de Freitas BALANCO; Pedro Paulo CHIEFFI; Sansão da Rocha WESTPHALEN; Carmem do Socorro GUILHERME; Anna Maria VALENTIM & Luiz Eloy PEREIRA	85-92
665	Enteroparasitoses no Estado de São Paulo: questão de saúde pública <i>Enteroparasitoses in São Paulo State: problems of public health</i> Eliseu Alves WALDMAN & Pedro Paulo CHIEFFI	93-99
666	Reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida <i>Immunofluorescence testes for toxoplasmosis in patients with AIDS</i> Cláudia Barleta do NASCIMENTO; José Eduardo TOLEZANO; Massami KAWARABAYA-SHI; José dos Reis COELHO; Maria Lúcia RAYMUNDO; Vanda de Sá LÍRIO; Mirthes UEDA; Ana Maria Carvalho de SOUZA; Luciana FERRARI & Walquíria P. PINTO . . .	101-106

667	Sorotipos de <i>Serratia marcescens</i> em infecções humanas <i>Serotypes of Serratia marcescens from human infections</i> Kinue IRINO; Tânia Mara Ibelli VAZ; Ilka Maria LANDGRAF; Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE & Vera Simonsen Dias VIERA	107-115
-----	---	---------

Notícias

	Centro Brasileiro de Informações sobre drogas psicotrópicas (CONFEN/UNFDAC)	117
	Índice de autor	119
	Índice de assunto	121
	Subject Index	123

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

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

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

Página de rosto

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

Texto

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

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

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

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

UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS – Deverão ser usadas somente as unidades legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos etc. – Resolução nº 11, de 12 de outubro de 1988, do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Diário Oficial*, Brasília, 21 out. 1988. Seção I, pt. 1, p. 20524-32. Aprova a Regulamentação Metrológica que com esta baixa e revoga a Resolução nº 01/82, de 27 de abril de 1982).

TABELAS – Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas 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	}	quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.;
0,0		
0,00		
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: ...TAUNAY^{3,1} verificou ...; para dois autores ... LEME & CARRIJO^{1,9}, pesquisando ...; para mais de dois autores: ... No trabalho de TSUNODA *et alii*⁶; ou ainda ... segundo vários autores^{1,3,7,8}.

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

Para artigos de periódicos

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

Ex.:

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

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra (em grifo), nº da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, nº de páginas, ou volumes (ou nº da página consultada).

Ex.;

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
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.

A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E O LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA

Os laboratórios de Saúde Pública no Brasil tiveram sua origem no final do século passado, visando solucionar a questão do controle de doenças transmissíveis, entre elas a febre amarela e a peste, que vinham constituindo obstáculos ao desenvolvimento do modelo econômico agro-exportador, então vigente no país, na substituição da mão de obra escrava pela de imigrantes europeus e posteriormente asiáticos, especialmente na lavoura cafeeira^{7,14,15}.

Essas instituições, após período de notável produtividade e à medida que eram solucionados, ainda que parcialmente, os problemas sanitários que haviam justificado sua criação, passaram a enfrentar, a partir de 1920, as conseqüências da diminuição de investimentos no setor saúde e paulatinamente entram em declínio com esparsas e exíguas fases de reflorescimento^{7,14}.

Somente na segunda metade da década de 1970 verificamos um esforço, calcado em decisão política dos governos federal e, em alguns casos, estaduais, em recuperar essas instituições, assim como a preocupação com a implantação de um sistema nacional de laboratórios de Saúde Pública, com o objetivo principal de oferecer suporte ao sistema nacional de vigilância epidemiológica criado em 1975^{7,15,16}.

A reestruturação e fortalecimento dos laboratórios de Saúde Pública no país a partir desse momento até os dias atuais foi indiscutível, particularmente, entre aqueles que já haviam apresentado destacado desempenho no início do século.

Paralelamente ao processo de recuperação dessas instituições, observamos nesse período medidas visando a reorganização de todo setor saúde do país, que tem seu marco inicial na lei federal promulgada em 1975, que dispõe sobre o sistema nacional de saúde e que culmina com a proposta de reforma sanitária em meados da década de 1980^{15,16}.

É justamente a questão relativa à adequação dos laboratórios de Saúde Pública à reforma sanitária, no que tange ao aspecto particular do apoio à vigilância epidemiológica, que pretendemos abordar nesse artigo. Deixaremos, no entanto, de discutir os reflexos na conceituação e definição de atribuições dessas instituições, decorrentes das mudanças ocorridas tanto nas formulações teóricas como nas práticas implementadas no campo da Saúde Pública, em face da incorporação por esse setor da assistência médica primária, em virtude de constituir assunto, por si só, muito abrangente.

Quanto ao tema específico que nos propusemos a desenvolver, é importante salientar que os laboratórios de Saúde Pública devem para tanto ser reorganizados, incorporando a filosofia imbutida na proposta de reforma sanitária, assim como a tecnologia desenvolvida, principalmente nas últimas duas décadas, pelos países industrializados, no campo do diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas e parasitárias. Cumpre porém considerar o acervo de experiências acumuladas em nosso meio, durante quase um século, nesse setor.

O apoio laboratorial à vigilância epidemiológica deveria ser oferecido em quatro planos. No primeiro deles, o papel atribuído às redes estaduais de laboratório de saúde pública seria o de efetuarem testes de confirmação diagnóstica, com vistas às ações de controle de doenças transmissíveis executadas, preferencialmente, pela rede básica de assistência médica.

Essa atividade deveria ser realizada fundamentalmente pelos laboratórios regionais que, para tanto, deveriam estar preparados, no que concerne às doenças infecciosas e parasitárias mais relevantes, nas respectivas áreas de abrangência. Ao laboratório central caberia a caracterização dos agentes patogênicos isolados nas unidades regionais e a execução de testes diagnósticos de doenças que pela baixa incidência no Estado não justificam sua descentralização.

O adequado cumprimento de tais atribuições implicaria na existência de perfeita coordenação técnica e administrativa entre os diversos níveis que compõem as redes estaduais de laboratório de Saúde Pública, organizadas num sistema hierarquizado e de complexidade crescente¹⁶.

Observada essa estrutura, o laboratório central, em face de sua condição de referência para o sistema, deveria estar habilitado a investigar a etiologia de todas as doenças infecciosas e parasitárias que podem, potencialmente, ocorrer no Estado, enquanto as unidades regionais utilizariam obrigatoriamente técnicas padronizadas.

Num segundo plano situar-se-iam as atribuições relativas à vigilância epidemiológica, visando principalmente a elucidação etiológica de agravos inusitados de provável etiologia infecciosa, a perfeita caracterização taxonômica de agentes patogênicos para o homem, a determinação de sua estrutura antigênica e de seus fatores de virulência, a pesquisa e identificação de marcadores epidemiológicos, o estudo da ecologia de microrganismos de interesse em Saúde Pública e identificação precoce da introdução de microrganismos mutantes na comunidade, e a avaliação das repercussões desse fato na saúde humana.

Nesse ponto, caberia aos laboratórios regionais oferecer suporte ao sistema de vigilância epidemiológica na implementação de pesquisas de campo e exercer função de primeira linha no apoio à investigação de epidemias de agravos à saúde de etiologia não conhecida.

O laboratório central deveria assumir a responsabilidade pela normatização, treinamento de pessoal e controle de qualidade dos serviços prestados pelas unidades regionais. Outra atribuição abrangeria o desenvolvimento de estudos minuciosos referentes a microrganismos patogênicos para o homem, isolados em sua área de abrangência, campo de atividade significativamente ampliado, nas duas últimas décadas, pelo desenvolvimento de novas e modernas técnicas, entre elas, as moleculares, abrangendo a utilização de sondas de ácidos nucleicos¹⁰. Essas técnicas aplicam-se ao diagnóstico rápido e caracterização de microrganismos causadores de doenças infecciosas, propiciando novos conhecimentos em nível genético e molecular, a respeito da patogenia desses agravos, além de permitir a execução de investigações epidemiológicas mais acuradas¹⁰. Um exemplo é a aplicação de sondas moleculares para a pesquisa de cepas toxigênicas de *E. coli* viabilizando o estudo da disseminação intra-familiar dessa bactéria e a sua transmissão, a partir de alimentos ou água, ao homem¹³.

Merecem igual destaque técnicas já consagradas, tais como a fagotipagem cuja aplicação, associada à análise molecular do gene responsável pela produção da enterotoxina pelo *Vibrio cholerae*, permitiu interessante investigação epidemiológica de casos de cólera identificados nos Estados Unidos da América, em 1978, durante a última pandemia dessa moléstia³.

Da mesma maneira que a moderna tecnologia aplicada em laboratório tornou a epidemiologia mais interessante e versátil, esta por sua vez, tem orientado o laboratório na identificação de agentes patogênicos para o homem.

A investigação da febre purpúrica brasileira é uma excelente demonstração dessa interação, pois, com a utilização adequada de técnicas clássicas e avançadas de laboratório e do método epidemiológico, foi possível a identificação do *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* como seu agente etiológico^{5,6}.

Nesse caso, a aplicação de técnicas moleculares propiciou condições para a perfeita classificação taxonômica do agente e pesquisa de marcadores epidemiológicos dessa bactéria, associados a sua característica invasora, através do estudo de padrões de restrição do gene rDNA¹¹. Por sua vez, a utilização do método clássico da aglutinação obteve sucesso na identificação de estruturas antigênicas específicas de clones invasivos desse agente, permitindo a sua utilização em testes de triagem para cepas patogênicas de *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*⁴.

A utilização conjunta dessas duas técnicas constitui atualmente, a arma mais eficaz disponível na vigilância epidemiológica da F.P.B., dado que a única medida que torna possível a redução da sua mortalidade e letalidade é a introdução precoce do tratamento específico.

Restam ainda dois importantes planos de atuação dos laboratórios de Saúde Pública buscando oferecer apoio ao sistema de vigilância epidemiológica. Um deles seria o do desenvolvimento e padronização de técnicas simples de baixo custo, boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, aplicáveis em testes de triagem, paralelamente a outras de maior complexidade e que apresentem alta sensibilidade e especificidade utilizadas como métodos padrões. Como exemplo do que se faz em nosso meio com esse objetivo, devemos referir o projeto, atualmente em desenvolvimento, de produção de uma sonda molecular aplicada ao diagnóstico rápido do dengue que constituirá, sem dúvida, peça importante para o programa de controle dessa arbovirose em nosso país^{1,8}.

O último plano, onde os Laboratórios de Saúde Pública teriam significativo papel a desempenhar, seria o da produção de substâncias imunobiológicas para diagnóstico e aplicação profilática. Esta

produção constitui, no entanto, ponto crítico, especialmente em países em desenvolvimento, pois implica na incorporação de "biotecnologia de ponta" nos campos da biologia molecular e de engenharia genética, como é o caso de obtenção, pela técnica do DNA recombinante, de vacinas e de vírus utilizados como inseticidas biológicos^{1,2}.

Atualmente está sendo testada a utilização da vacina, modificada por técnicas de engenharia genética, para conferir imunidade contra raiva em animais silvestres. Sua aplicação se dará pela disseminação deliberada, no meio ambiente, do vírus da vacina alterado, contendo os genes necessários do vírus rábico, para infectar e proteger animais contra essa zoonose².

A aplicação de novas estratégias no controle ou erradicação de doenças infecciosas tem alcançado, nas últimas décadas, resultados sem dúvida animadores. Porém, a extinção artificial de populações, tal como aconteceu com a do vírus da varíola, assim como a dispersão de microrganismos modificados no ambiente devem ser analisadas com cautela, pois desconhecemos, por exemplo, as repercussões, ao nível ecológico, da varíola simiana, à medida que venha a atingir maiores segmentos da população humana ou, ainda, as conseqüências da circulação mais ampla de vírus modificados no meio ambiente^{2,9,12}.

A análise e a investigação de temas como esses situar-se-ão provavelmente entre os desafios a serem enfrentados pela vigilância epidemiológica, na próxima década, e os laboratórios de saúde pública deverão estar preparados para dar resposta a tais questões.

São Paulo, 10 de março de 1989.

Eliseu Alves Waldman
Divisão de Biologia Médica
Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARARDI, C.R.M. & FELIPPE, J.M.N.S. – Preliminary study of method standardization for dengue confirmatory diagnosis by means of molecular biology. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, São Lourenço, MG, 1988. p. 38. *Resumos*
2. BISHOP, D.H.L. – Release of genetically altered viruses into the environment. *Brit. med. J.*, **296**:1685-6, 1988.
3. BLAKE, P.A.; ALLEGRA, D.T.; SNYDER, J.D.; BARRETT, T.J.; Mac FARLAN, L.; CARAWAY, C.T.; FEELEY, J.C.; GIANG, J.; LEE, J.V.; PUHR, N.D. & FELDMAN, R.A. – Cholera. A possible endemic focus in the United States. *N. Engl. J. Med.*, **302**: 305-15, 1980.
4. BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; TONDELLA, M.L.C.; SACCHI, C.I.; LANDGRAF, I.M.; ZANELLA, R.C.; BIBB, W.F.; IRINO, K. & GRUPO DE ESTUDO DA FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA – Caracterização rápida de cepas invasivas do *Haemophilus aegyptius*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **31**(4), 1989. No prelo.
5. BRAZILIAN PURPURIC FEVER TASK FORCE – Preliminary report: epidemic fatal purpuric fever among children - Brazil. *MMWR*, **34**(16): 217-9, 1985.
6. BRAZILIAN PURPURIC FEVER TASK FORCE – Brazilian purpuric fever: *Haemophilus aegyptius* bacteremia complicating purulent conjunctivitis. *MMWR*, **35**(35):553-4, 1986.
7. CHIEFFI, P.P. & WALDMAN, E.A. – Instituto Adolfo Lutz (1940-1984), desafios de um laboratório de Saúde Pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **46**(1/2): 19-25, 1986.

8. FELIPPE, J.M.M.S. & BARARDI, C.R.M. – Biotecnologia no estudo de arboviroses de interesse em Saúde Pública *Bol. Biotecnol., Agropec., Energia, Saúde*, **23**:4, 1988.
9. FORATTINI, O.P. – Varíola, erradicação e doenças infecciosas. *Rev. Saúde públ.*, **22**(5): 371-3, 1988.
10. GLASS, R.I. – New prospects for epidemiologic investigations. *Science*, **234**:951-5, 1986.
11. IRINO, K.; GRIMONT, F.; CASIN, J.; GRIMONT, P.A.D. & BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - rRNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius strains associated with Brazilian purpuric fever. *J. clin. Microbiol.*, **26**(8): 1535-8, 1988.
12. LEDERBERG, J. – Medical science, infectious diseases, and the unity of humankind. *JAMA*, **260**(5): 684-5, 1988.
13. MOSELEY, S.L.; ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TIRAPAT, C.; CHACUMPA, W.; SAKULDAIPEERA, T. & FALKOW, S. – Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J. infect. Dis.*, **145**(6): 863-9, 1982.
14. STEPAN, N. – *Gênese e evolução da ciência brasileira: Oswaldo Cruz e a política de investigação científica e médica*. Rio de Janeiro, Artenova, c1976. p. 101-45.
15. WALDMAN, E.A. – Diretrizes de uma política para a rede de laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **41**(1):15-21, 1981.
16. WALDMAN, E.A. & MIRANDA, J.B.N. – Experiência da rede de laboratórios do Instituto Adolfo Lutz em época recente (período 1976-1984): subsídios para a elaboração de novas diretrizes para o Sistema Estadual de Laboratórios de Saúde Pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. **46**(1/2): 27-43, 1986.

CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE PREPARAÇÕES EXTRATIVAS DE *ALLIUM SATIVUM* L.*

Vânia Rodrigues HOPPEN**
Mariangela Tirico AURICCHIO**
Mônica Arcon BATISTIC**

RIALA6/651

HOPPEN, V.R.; AURICCHIO, M.A. & BATISTIC, M.A. – Caracterização por cromatografia em camada delgada de preparações extrativas de *Allium sativum* L. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 5-10, 1989.

RESUMO: Utilizando cromatografia em camada delgada, foram investigadas várias possibilidades de detecção de substâncias características do alho, seja de compostos responsáveis pelo aroma, presentes no óleo, ou de compostos de natureza aminoácida, presentes nos extratos hidroalcoólicos e nas preparações que contêm elementos histológicos de *Allium sativum* L. Foram selecionados dois sistemas cromatográficos que permitiram caracterizar estas duas classes de compostos em preparações contendo óleo de alho ou extrato hidroalcoólico de alho.

DESCRITORES: alho (*Allium sativum*), extrato hidroalcoólico de, identificação; alho, óleo essencial de, identificação; medicamentos, extrato hidroalcoólico de alho em, detecção; medicamentos, óleo essencial de alho em, detecção; óleo essencial de alho em medicamentos, identificação; cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L., Fam.: Liliaceae), é uma planta amplamente distribuída e utilizada por todas as partes do mundo, mas particularmente pelos países mediterrâneos, não só como alimento e condimento, mas também como agente profilático e curativo^{1,2,3, 21}. A tintura e alcoolatura são utilizadas como hipotensores e hipoglicemiantes. Na medicina caseira, utiliza-se o alho como vermífugo e, externamente, como antisséptico de feridas^{1,7,9,13,20,21}.

Devido ao seu considerável poder curativo, o alho tem sido repetidamente objeto de pesquisas sob muitos pontos de vista.

Em 1945, CAVALLITO et alii^{4,5,6} demonstraram que havia no alho um aminoácido, na concentração de 0,3-0,4%, que, pela ação de enzimas, era decomposto em alicina.

A aliina, sulfóxido de (+)-S-alil-L-cisteína, isolada por STOLL & SEEBECK²¹, é hoje

conhecida como precursora do principal princípio ativo do alho. Trata-se de substância de alto peso molecular, bastante estável, inodora, hidrossolúvel, sem atividade antimicrobiana, que, pela ação da aliinase, é convertida em uma substância fortemente antimicrobiana chamada alicina.

A alicina é um óleo instável, incolor, com odor característico do alho, cuja ação antimicrobiana ainda se faz presente nas diluições de 1:85.000 até 1:125.000 contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas^{4,21}. CAVALLITO & BAILEY⁴ estabeleceram que 1 mg de alicina equivale a aproximadamente 15 unidades Oxford de penicilina.

A decomposição da aliina pela aliinase produz, ao lado da alicina, ácido pirúvico e amônia^{12,13,20}. Este mecanismo de ação fundamentou o método de determinação fotométrica da alicina proposto por JÄGER¹³, que se baseia na reação do ácido pirúvico com dinitrofenilhidrazina, com formação de um composto colorido.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Entretanto, HÖRHAMMER et alii¹² demonstraram, através de cromatografia em camada delgada, que existem no alho, ao lado da aliina, outros sulfóxidos de alquicisteína de mesma configuração óptica da aliina, que, ao serem decompostos pela aliinase, também fornecem ácido pirúvico. Os tiosulfinafos resultantes, porém, possuem uma ação antibacteriana muito menor em comparação com a alicina, o que não permite a substituição do método microbiológico pelo método químico proposto por Jäger.

GRANROTH¹⁰, utilizando eletroforese bidimensional, separou aminoácidos sulfurados e peptídeos, evitando assim a cromatografia em papel³, por ser esta uma técnica que demanda tempo, não permite a separação destes compostos sem decomposição e não possibilita a separação de isômeros. A eletroforese aumentou a sensibilidade da separação em 50 vezes.

Outras tentativas de avaliação dos componentes do alho voltaram-se para o seu óleo essencial^{16,17,18,22}. Sabe-se que o alho triturado, deixado em repouso, ou o produto de sua destilação por arraste a vapor fornece, a partir da alicina, dialildissulfetos e alilpolisulfetos, além de compostos provenientes da decomposição dos análogos da aliina. Segundo alguns autores^{11,18,21}, o teor de óleo essencial de alho por destilação por arraste a vapor é da ordem de 0,1-0,2%.

Na obtenção do óleo essencial, têm lugar profunda decomposição da aliina e da alicina, de modo que o óleo assim obtido tem um teor de enxofre que representa apenas uma fração do enxofre total encontrado no alho fresco¹⁹. Jäger propõe um método clássico de doseamento de enxofre baseado na precipitação do mesmo por BaCl₂.

Um avanço nestes estudos representou o método de MICHAHELLES¹⁵, no qual a alicina, após separação por cromatografia em camada delgada e reação com reativo N-etilmaleimida, solução de hidróxido de potássio e de ácido ascórbico, é determinada espectrofotometricamente.

Mais recentemente, foi introduzida a cromatografia em fase gasosa^{2,17} que, no entanto, devido à instabilidade da alicina, avalia apenas os produtos de sua decomposição, tais como, vinilditiina e diversos alquildi e trissulfetos.

MIETHING¹⁶ apresentou um método de determinação de alicina e de óleo de alho através de cromatografia líquida de alta resolução. Por esse método, o teor de alicina varia de 0,37 a 2,78%. Se, na destilação por arraste a vapor, a alicina fosse quantitativamente transformada nos componentes do óleo de alho, principalmente

dialildissulfetos, dever-se-ia encontrar teores de óleo bem mais altos do que os encontrados. Porém, apenas uma pequena parte (cerca de 10%) da quantidade original de alicina é encontrada no destilado sob forma de óleo de alho, não sendo, portanto, medida suficiente para a avaliação do alho fresco. A alicina propriamente dita, devido à sua pouca estabilidade, não é encontrada nem no destilado nem no resíduo da destilação.

Mais tarde VOIGT & WOLF²² propuseram um método de cromatografia líquida de alta resolução para determinação quantitativa dos produtos de transformação da alicina, onde se recorre a uma substância padrão de referência, estável, já que a alicina, mesmo à temperatura ambiente, sofre rearranjos que resultam na formação de uma série de outros compostos, que justificariam os valores muito altos de alicina encontrados por Miething.

Contudo, apesar de métodos altamente sofisticados, usados para a determinação dos componentes do alho, nem todo laboratório poderá utilizá-los devido à não disponibilidade de equipamentos e de reativos especiais.

Em função da necessidade de se controlar a presença de alho ou de seus componentes em formulações fitoterápicas, o presente trabalho, utilizando-se de técnicas de cromatografia em camada delgada, permite a identificação, não só de substâncias com caráter de aminoácido, como também de compostos sulfurados do óleo de alho, produto da degradação da alicina, estabelecendo, assim, perfis cromatográficos característicos para as várias preparações farmacêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados óleos de alho obtidos no laboratório da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz a partir de alho fresco, extratos hidroalcoólicos do alho, cápsulas de óleo de alho vendidas no comércio e pílulas contendo extrato concentrado de alho. Como padrões, foram utilizados óleos de alho provenientes da Holanda, México, Estados Unidos e França.

Extração do óleo essencial de alho a partir de alho fresco

Foi feita da seguinte maneira:

a) Por destilação pelo arraste a vapor de água (Pav) em aparelho Cocking e Middleton⁸.

b) Por extração direta a frio (Pext) com uma mistura de éter clorofórmio (80:20); neste caso, fez-se uma modificação no método de extração preconizado por SCHULTZ & MOHRMANN¹⁷. Em vez de se extrair o óleo de alho

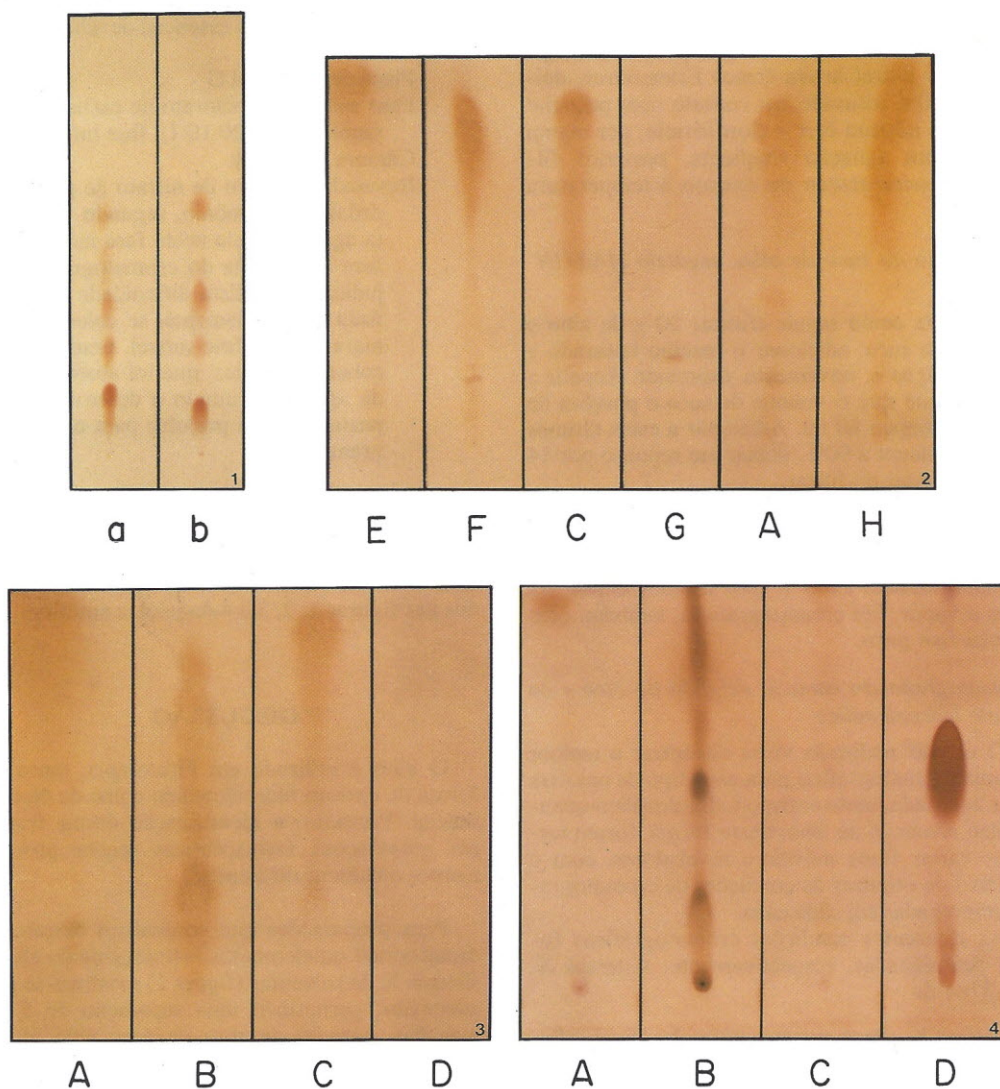


FIGURA 1 – Cromatograma do extrato hidroalcoólico (a) e da tintura comercial (b), onde foi empregado o Sistema X. R_f de 0,15 a 0,74.

FIGURA 2 – Cromatograma de óleos de alho de várias procedências, México (E), França (F), Estados Unidos (C), Holanda (G), do óleo obtido por arraste a vapor (A), e do óleo de alho comercial, onde foi empregado o Sistema Z.

FIGURA 3 – Cromatograma de amostras de alho obtidas por arraste a vapor (A) e por extração com solvente a frio (B), do padrão de óleo de alho (C) e padrão do óleo vegetal fixo (D), onde foi empregado o Sistema Y_1 .

FIGURA 4 – Cromatograma de amostras de alho obtidas por arraste a vapor (A) e por extração com solvente a frio (B), do padrão de óleo de alho (C) e padrão de óleo vegetal fixo (D), onde foi empregado o Sistema Y_2 .

em funil de separação, que apresenta o inconveniente de formar uma emulsão persistente, optou-se por extraí-lo em frasco Erlenmeyer, deixando o alho triturado em contato com pequeno volume da mistura éter – clorofórmio, por algum tempo, com agitação freqüente, posterior filtração e concentração do extrato à temperatura ambiente.

Preparação do suco de alho, segundo MARTINDALE¹⁴

Foi feita como segue: triturar 80 g de alho e espremer o suco: adicionar o resíduo triturado a 20 ml de água e, novamente, espremer. Repetir a operação até que o volume de suco e porções de lavagem atinjam 80 ml. Adicionar a estes últimos 20 ml de álcool a 90%, deixar em repouso por 14 dias e decantar ou filtrar.

Foram reconstituídas cápsulas de óleo de alho, misturando óleo de alho e óleo vegetal fixo nas proporções de 1:4 e 1:10. Estas amostras foram cromatografadas antes e após destilação por arraste a vapor. Foi cromatografado, também, óleo vegetal fixo puro.

Cromatografia em camada delgada do óleo e do extrato hidroalcoólico

O estudo realizado visou encontrar o melhor sistema cromatográfico para cada tipo de amostra a ser analisada, tanto extrato hidroalcoólico quanto óleo essencial de alho; desta forma, foram testadas várias fases móveis e reveladores, com o objetivo de otimizar as condições de cromatografia empregadas em cada caso.

As diferentes condições cromatográficas foram denominadas, respectivamente, sistemas X, Y₁, Y₂ e Z.

- a) *Sistema X* – Para extratos hidroalcoólicos, pílulas contendo extrato concentrado de alho, e cápsulas contendo elementos histológicos do alho

Placa de sílica gel G

Fase móvel: n-butanol – n-propanol – ácido acético – água (3:1:1:1)

Saturação da cuba: total

Percurso: 15 cm

Revelador: reativo de ninidrina, segundo STAHL¹⁹

- b) *Sistema Y₁ e Y₂* – para óleo essencial de alho

Placa de sílica gel G

Fase móvel: benzeno

Câmara Sandwich

Percurso: 10 cm

Reveladores: Y₁, reativo anisaldeído – ácido sulfúrico, segundo STAHL¹⁹; Y₂, reativo nitrato de prata – hidróxido de amônio, segundo STAHL¹⁹.

- c) *Sistema Z* – para óleo essencial de alho

Placa de Sílica gel G

Fase móvel: tetracloreto de carbono – metanol – água (20:10:1), fase inferior

Câmara Sandwich

Revelador: reativo de nitrato de prata - hidróxido de amônio, segundo STAHL¹⁹ (a água presente nesta fase móvel interfere na corrida do cromatograma, prejudicando-a. Esta dificuldade é contornada se, previamente, se colocar na câmara, com a fase móvel, uma placa recoberta de sílica, que irá absorver parte da água, permitindo o desenvolvimento posterior, sem prejuízo para o cromatograma).

RESULTADOS

Os cromatogramas obtidos nas condições da análise anteriormente descritas estão apresentados nas figuras 1, 2, 3 e 4 da página anterior.

DISCUSSÃO

O alho é utilizado em Fitoterapia, tanto sob forma de extrato hidroalcoólico como de óleo essencial. Portanto, a identificação destas frações em preparações farmacêuticas requer procedimentos analíticos diferentes.

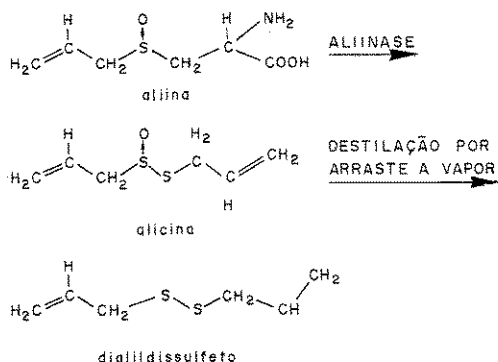
Para preparações que contenham extrato hidroalcoólico ou elementos histológicos de alho, o sistema X de solventes (figura 1) mostrou-se mais adequado, permitindo uma separação de 5 a 6 manchas, coradas de rosa-violáceo pelo reativo de ninidrina, segundo STAHL¹⁹. A utilização do reativo ninidrina - nitrato cúprico, defendida por HÖRHAMMER et alii¹², que permitiria uma diferenciação dos sulfóxidos dos derivados de cisteína por diferença de coloração, não foi satisfatória, provavelmente pelo fato de que nenhuma purificação dos extratos foi efetuada.

No caso de cápsula de óleo de alho, a utilização de benzeno, sistema Y, (figuras 3 e 4) como fase móvel, não se mostrou muito satisfatória, uma vez que a migração dos componentes separou manchas com R_f muito alto. O reativo anisaldeído, utilizado inicialmente, apresentou o inconveniente de revelar óleos vegetais fixos como manchas roxo-amarronzadas que mascaram o perfil cromatográfico do óleo de alho propriamente dito (figura 3); porém, permitiu a diferenciação entre os perfis cromatográficos de amostras de óleo de alho, obtidas por arraste a vapor (A), e extração com solvente a frio (B), e as

amostras padrão de óleo de alho (C) e óleo vegetal fixo (D).

A figura 3 evidencia a semelhança entre os perfis cromatográficos da amostra de óleo de alho obtida por arraste a vapor (A) e do padrão de óleo de alho (C), bem como a sua diferença em relação ao óleo de alho, obtido por extração com solvente a frio (B), quando o revelador é o nitrato de prata-hidróxido de amônio, segundo STAHL¹⁹. Nenhuma mancha foi observada para o óleo vegetal fixo (D).

Tanto os óleos de alho preparados na Seção, a partir de alho fresco, como aqueles provenientes da França, Holanda, Estados Unidos e México, usados como padrão, ou aqueles colocados à venda no comércio sob a forma de “cápsulas de óleo de alho” apresentaram no sistema Z (figura 2) mancha difusa, característica, de tonalidade cinza-amarelada e Rf-0,9. Segundo a literatura^{16,18}, trata-se de dialildissulfeto, principal componente do óleo de alho, obtido por destilação por arraste a vapor segundo o esquema abaixo:



Esta seria a única mancha comum a todos os óleos por nós analisados, pois as demais, que ocasionalmente apareceram, estariam possivelmente relacionadas, entre outros fatores, à origem do alho, modo de obtenção do óleo e impurezas.

No entanto, óleos obtidos por extração direta a frio apresentaram perfil cromatográfico diferente dos acima citados: a mancha correspondente ao dialildissulfeto não foi significativa e as outras manchas, que aparecem ao longo de todo percurso, permitem supor que a ausência de calor impede que a decomposição da aliina obedeça ao esquema acima.

O sistema Z foi o que, pela sua sensibilidade e reprodutibilidade, forneceu resultados mais satisfatórios.

A comercialização do óleo de alho é feita através de cápsulas gelatinosas de óleo de alho, que, na maioria das vezes, encontra-se em presença de óleo vegetal fixo. Com base nisso, experimentamos “reconstituir” cápsulas de óleo de alho nas proporções de 1:4 e 1:10. Estas amostras foram submetidas a destilação por arraste a vapor e posteriormente cromatografadas ao lado dos padrões. Este procedimento mostrou ser desnecessária a destilação, uma vez que a identificação dos dialildissulfetos é possível sem a separação do óleo volátil da do fixo e, ainda, que estejam na proporção de 1:10.

RIALA6/651

HOPPEN, V.R.; AURICCHIO, M.A. & BATISTIC, M.A. – Thin-layer chromatography of preparations from *Allium sativum* L. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(1): 5-10, 1989.

ABSTRACT: By using thin-layer chromatography the detection of characteristic substances contained in garlic such as the compounds responsible by the scent and those of aminoacid nature were investigated. Such study was made by analyzing hidroalcoholic extracts and preparations containing histologic elements of *Allium sativum* L. Two thin-layer chromatographic systems were selected in order to detect these two groups of compounds in preparations containing garlic oil or garlic hidroalcoholic extract.

DESCRITORES: garlic (*Allium sativum*), hidroalcoholic extract of, identification; garlic, essential oil of, identification; pharmaceuticals, garlic hidroalcoholic extract in, detection; pharmaceuticals, garlic essential oil in, detection; oils, garlic essential oil detection; thin-layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKER, H. – Knoblauch-nur Gewürz oder auch Phytopharmakon?. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **125** (34): 1677-80, 1985.
2. BRODNITZ, M.H.; PASCALE, J.V. & DERSLICE, L.V. – Flavor components of garlic extract. *J. agric. Food Chem.*, **19** (2): 273-5, 1971.
3. CARSON, J.F. & WONG, F.F. – A new colorimetric test for detecting sulfur-containing amino acids. *J. Chromatogr.*, **12** (1903): 408-9, 1963.
4. CAVALLITO, C.J. & BAILEY, J.H. – Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. am. chem. Soc.*, **66**: 1950-1, 1944.
5. CAVALLITO, C.J.; BAILEY, J.H. & BUCK, J.S. – The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and "essential oil of garlic". *J. am. chem. Soc.*, **67**: 1032-3, 1945.
6. CAVALLITO, C.J.; BUCK, J.S. & SUTER, C.M. – Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. *J. am. chem. Soc.*, **66**: 1952-4, 1944.
7. COSTA, A.F. – *Farmacognosia*. 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian [1967], v. 2, p. 925-7.
8. COSTA, A.F. – *Farmacognosia*. v. 3: *Farmacognosia experimental*. 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian [1967], p. 482-5.
9. ESSMAN, E.J. – The medicinal uses of herbs. *Fito-terapia*, **55** (5): 279-89, 1984.
10. GRANROTH, B. – Separation of *Allium sulfur* amino acids and peptides by thin-layer electrophoresis and thin-layer chromatography. *Acta chem Scand.*, **22** (10): 3333-5, 1968.
11. GUENTHER, E. – *The essential oils*. 1. Mitteilung: *chromatographische Untersuchungen über die genuinen Inhaltsstoffe – von Allium sativum* L. New York, Van Nostrand, 1952. p. 67-9.
12. HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H.; SEITZ, M. & VEJDELEK, Z.J. – Zur Wertbestimmung von Knoblauchpräparaten. *Pharmazie*, **23**: 462-6, 1968.
13. JÄGER, H. – Quantitative Bestimmung von Allicin in Frischen Knoblauch. *Arch. Pharm., Weinh.*, **288** (3): 145-8, 1955.
14. MARTINDALE, W.H. – *The extra pharmacopoeia*; edited by L.F. Reynolds and Anne B. Prasad. 28th ed. London, Pharmaceutical Press, 1982. p. 688-9.
15. MICHAHELLES, E. apud MIETHING, H. ¹⁶.
16. MIETHING, H. – Allicin und Öl in Knoblauchzwiebeln – HPLC – Gehaltsbestimmung. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **125** (41): 2049 - 50, 1985.
17. SCHULZ, O.E. & MOHRMANN, H.L. – Beitrag zur Analyse der Inhaltsstoffe von Knoblauch - *Allium sativum* L. 1. Mitteilung: Dumschicht-chromatographie des Knoblauchöls. *Pharmazie*, **20** (7): 379-81, 1965.
18. SCHULTZ, O.E. & MOHRMANN, H.L. – Beitrag zur Analyse der Inhaltsstoffe von Knoblauch - *Allium sativum* L. 2. Mitteilung: gaschromatographie des Knoblauchöls. *Pharmazie*, **20**(7):441-7, 1965.
19. STAHL, E., ed. – *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook*. 2nd ed. English translation by M.R.F. Achworth. Berlin, Springer-Verlag, 1969. p. 1041.
20. STOLL, A. & SEEBECK, E. – Chemical investigations on Alliin, the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol.*, **11**:377-400, 1951.
21. STOLL, A. & SEEBECK, E. – Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung: Über chromatographie. *Helv. Chim. Acta*, **31**: 189-210, 1948.
22. VOIGT, M. & WOLF, E. – Knoblauch-HPLC – Bestimmung von Knoblauchwirkstoffen in Extrakten, Pulver und Fertigarzneimitteln. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **126** (12): 591-3, 1986.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1988.

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PARA PESQUISA DE SUJIDADES E VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIGIENE DAS MASSAS ALIMENTÍCIAS POR MICROSCOPIA*

Claydes de Quadros ZAMBONI**
Márcia Bittar ATUI**

RIALA6/652

ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. — Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 11-17, 1989.

RESUMO: Foram analisadas 150 amostras de macarrão, sendo 50 com ovos, 50 comum e 50 de sêmola, de agosto de 1985 a novembro de 1987. Foram utilizados dois métodos de extração de sujidades leves, o da digestão com pancreatina e o da hidrólise ácida, a fim de verificar a eficiência destes quanto à recuperação de sujidades, ao menor tempo na execução do método, à facilidade de processamento, e às condições higiênicas do macarrão. Pelo método da hidrólise ácida, foram condenadas 48% das amostras de macarrão com ovos, 80% das de macarrão comum e 58% das do macarrão de sêmola. Pelo método da hidrólise enzimática, foram condenadas 36% das amostras de macarrão com ovos, 50% das de macarrão comum e 40% das de macarrão de sêmola de trigo. Concluiu-se que o método da hidrólise ácida é mais eficiente, além de ocupar o analista em tempo menor e utilizar reagentes de mais fácil aquisição e menos dispendiosos; ainda, que o macarrão comum apresentou a pior qualidade, quando se usou como parâmetro o número de fragmentos de insetos e o de outras sujidades leves. Sugere-se que seja mantida a legislação atual, que exige ausência de pelos de roedor, ácaros vivos e/ou mortos, insetos vivos e/ou mortos e larvas de insetos vivos e/ou mortos, e que sejam tolerados 30 fragmentos de insetos em 225 g de macarrão, visto que 50% do total das 150 amostras estava no limite proposto, quando analisadas pelo método da hidrólise ácida.

DESCRITORES: macarrão, impurezas de origem biológica em, detecção microscópica; macarrão, impurezas de origem biológica em, extração; métodos, hidrólise enzimática, hidrólise ácida.

INTRODUÇÃO

As massas alimentícias ou macarrão, que têm como principal matéria-prima a farinha ou sêmola de trigo, podem apresentar contaminação biológica causada pelos próprios ingredientes, ou adquirida na sua elaboração.

Os principais contaminantes encontrados em massas alimentícias são fragmentos de insetos originários do trigo, contaminado por pragas do campo ou nos armazéns, empregado na sua fabricação; pela manipulação ou estocagem de farinha em condições higiênicas insatisfatórias, e pelos insetos que atacam o macarrão durante a sua

elaboração. Os insetos envolvidos neste processo pertencem principalmente aos gêneros *Sitophilus*, *Oryzaephilus*, *Tribolium*, *Rhizopertha* e *Ephestia*. São encontrados, também, outros contaminantes, como pelos de roedor, que são provenientes dos excrementos deixados por ratos ou camundongos no trigo ou na farinha estocada. Além disso, se a estocagem do trigo, da farinha ou do macarrão for inadequada, em ambiente com umidade relativa superior a 68% e temperatura elevada, condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, e não for executada limpeza do ambiente, há probabilidade do desenvolvimento de ácaros naqueles produtos.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 1º Congresso Brasileiro de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Afins e 6º Congresso Paulista de Farmacêuticos, São Paulo, SP, 1987.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Os defensivos agrícolas ou ambientais podem reduzir, mas não eliminam totalmente os insetos do campo ou dos produtos armazenados; na impossibilidade de se evitar tais contaminações, pode-se concordar em tolerar a presença dessas sujidades, na forma de fragmentos, desde que a quantidade seja reduzida.

A legislação em vigor tolera até 30 fragmentos de insetos em 100 g de amostra de massas alimentícias, padrão esse a que a indústria do setor alega não ser possível obedecer, sugerindo uma tolerância de até 60 fragmentos de insetos em 100 gramas do referido produto. Nos resultados das pesquisas efetuadas, separamos o número de fragmentos de insetos, encontrados nas análises, de 0 a 30, de 31 a 60 e mais de 60, para verificar a situação atual com relação a esses parâmetros^{4,5,8}.

Tendo em vista o problema sanitário, devemos levar em conta dois aspectos relacionados com a presença de insetos, fragmentos de insetos, ácaros, excrementos e pelos de roedor em um alimento: o da degradação dos nutrientes causada pela espécie que se desenvolveu no alimento e o da contaminação com produtos do metabolismo dessa praga, como excrementos, exúvias, secreções, larvas, ovos, espécimes mortos.

Pesquisas realizadas nos últimos anos em vários países, tendo como objetivo verificar a relação que alimentos contaminados com insetos e ácaros têm com a saúde do homem, mostraram haver uma atividade alérgica crescente, seja pelo contato com a pele e as vias respiratórias ou através da ingestão desses alimentos⁹. As baratas, ratos, moscas, formigas, camundongos, que são pragas oportunistas, são importantes como vetores, porque estão sempre em contato com fontes de bactérias patogênicas como esgoto, esterco, solo, fezes e outros.

A importância da pesquisa desse material estranho de origem biológica é cada vez mais compreendida, havendo necessidade do emprego de métodos mais precisos e que demandem menos tempo, a fim de se obter uma visão das condições de higiene dos produtos alimentares.

O objetivo deste trabalho é o de analisar massas alimentícias para verificar as condições higiênicas das mesmas, levando em conta a presença de insetos, fragmentos de insetos, ácaros e pelos de roedor, utilizando dois métodos de extração de sujidades leves, em paralelo: um, que usa como agente de digestão, a pancreatina, e de extração, o querosene; outro, em que é utilizada a hidrólise ácida em autoclave, e como agente extrator, óleo mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 150 amostras de massas alimentícias, assim distribuídas: 50 amostras de macarrão com ovos, 50 de macarrão comum e 50 amostras de macarrão de sêmola, de diferentes marcas, adquiridas em vários supermercados e mercearias da Capital e do Interior do Estado de São Paulo, além de algumas enviadas para o laboratório por indústrias a fim de serem submetidas à análise de orientação, de agosto de 1985 a novembro de 1987.

Simultaneamente, foram contaminadas no laboratório amostras-padrão de massas alimentícias com 10 élitros, 10 coleópteros adultos, 20 pelos de camundongos e 10 larvas de insetos. A contaminação foi efetuada segundo as técnicas descritas por BRICKEY et alii⁶.

Para a extração de sujidades leves, foram utilizados dois métodos:

Método da digestão com pancreatina

Foi utilizado um tamis nº 140 para remover a contaminação que ocorreu antes da moagem e os elementos histológicos dos vegetais. A seguir, foi feita extração no frasco armadilha de Wildman, usando querosene. Foram feitas algumas adaptações às condições do laboratório, já descritas em trabalhos anteriores^{11,12}.

Método da hidrólise ácida

Foi utilizado um tamis nº 230 para remover a contaminação e os elementos histológicos. A seguir, foi feita extração com óleo mineral, em percolador, segundo o "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists"^{1,2,3} e "American Association of Cereal Chemists Approved Methods"¹⁰, que descrevemos a seguir:

Pesar 225 g de amostra em um béquer de 1,5 a 2 litros. Adicionar à amostra 1 litro de ácido clorídrico (30 + 970) e 0,3 ml de solução anti-espuma (1g de Dow Corning Antifoam A diluído em 20 ml de acetato de etila). Autoclavar a 121°C. Transferir para um tamis nº 230 e lavar com água quente (50-70°C) para remover todo o líquido inicial e a maior porção do material mais fino. Transferir novamente o material que ficou no tamis para o béquer, utilizando água quente até cerca de 1 litro. Adicionar 30 ml de ácido clorídrico, 50 ml de óleo mineral (nujol). Adaptar um agitador mecânico ao béquer.

Agitar durante 6 minutos. Transferir imediatamente o material para um percolador contendo 250 ml de água quente. Lavar as paredes do béquer com água quente, para retirada do resíduo e adicionar esta água ao percolador. Completar até

o volume de 1.700 ml com água quente. Depois de 2 a 3 minutos, retirar a camada inferior até que o volume da mistura no percolador fique reduzido a 250 ml. Desprezar o líquido drenado e tornar a completar o volume de 1.700ml com água quente, lavando as paredes do percolador. Depois de 2 a 3 minutos, retirar a camada inferior e tornar a completar o volume com água quente, repetindo a operação por mais duas vezes (depois disso a camada inferior deve ficar quase que completamente livre de matéria em suspensão; se isso não ocorrer, repetir as lavagens por uma ou mais vezes). Descarregar, finalmente, a camada de água-óleo até a marca de 250 ml; colocar o béquer utilizado no início da técnica sob o percolador e descarregar totalmente. Lavar imediatamente as paredes do percolador com porções aproximadas de 50 ml de água quente, álcool etílico e água fervente.

Transferir o material do béquer para um papel

de filtro riscado com linhas paralelas distantes 5mm entre si, adaptado a um funil de Büchner, e filtrar a vácuo. Lavar o béquer com porções de 50 ml de álcool etílico, usando um bastão de vidro com extremidade protegida com borracha, para limpar as paredes do béquer, quando necessário.

Examinar os papéis ao microscópio estereoscópico com aumento de 30 X.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises de sujidades em massas alimentícias estão expressos nas tabelas 1, 2 e 3.

Os resultados obtidos nas análises das amostras padrão, contaminadas no laboratório e submetidas aos dois métodos em estudo, mostraram haver recuperação completa dos contaminantes adicionados.

TABELA 1

Sujidades em macarrão com ovos, macarrão de sêmola e macarrão comum, analisados pelo método de hidrólise ácida

Amostras		Macarrão com ovos		Macarrão de sêmola		Macarrão comum	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sujidades	Fragmentos de insetos	0 a 30 31 a 60 + de 60	64 22 14	28 13 9	56 26 18	15 8 27	30 16 54
	Total	50	100	50	100	50	100
	Pelos de roedores	0 1 a 2	92 8	38 12	76 24	47 3	94 6
Total	50	100	50	100	50	100	
Insetos mortos	0 + de 1	49 1	98 2	49 1	98 2	46 4	92 8
	Total	50	100	50	100	50	100
	Larvas de insetos mortas	0 + de 1	49 1	98 2	50 0	100 0	50 0
Total		50	100	50	100	50	100
Ácaros mortos		0 + de 1	49 1	98 2	47 3	94 6	50 0
	Total	50	100	50	100	50	100

TABELA 2

Sujidades em macarrão com ovos, macarrão de sêmola e macarrão comum, analisados pelo método da hidrólise enzimática

Amostras		Macarrão com ovos		Macarrão de sêmola		Macarrão comum	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sujidades de insetos	0 a 30	39	78	32	64	27	54
	31 a 60	6	12	12	24	11	22
	+ de 60	5	10	6	12	12	24
Total		50	100	50	100	50	100
Pelos de roedor	0	45	90	47	94	47	94
	1 a 2	5	10	3	6	3	6
	Total	50	100	50	100	50	100
Insetos mortos	0	49	98	49	98	49	98
	+ de 1	1	2	1	2	1	2
	Total	50	100	50	100	50	100
Larvas de insetos mortas	0	48	96	50	100	48	96
	+ de 1	2	4	0	0	2	4
	Total	50	100	50	100	50	100
Ácaros mortos	0	49	98	48	96	50	100
	+ de 1	1	2	2	4	0	0
	Total	50	100	50	100	50	100

TABELA 3

Classificação das amostras de macarrão com ovos, macarrão comum e macarrão de sêmola analisadas pelos métodos da hidrólise enzimática e da hidrólise ácida, com referência à legislação em vigor

Amostras	Métodos empregados											
	Hidrólise enzimática						Hidrólise ácida					
	Macarrão c/ ovos		Macarrão comum		Macarrão sêmola		Macarrão com ovos		Macarrão comum		Macarrão sêmola	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Condenadas	18	36	25	50	20	40	24	48	40	80	29	58
Aprovadas	32	64	25	50	30	60	26	52	10	20	21	42
Total	50	—	50	—	50	—	50	—	50	—	50	—

DISCUSSÃO

À vista dos resultados obtidos, verifica-se que, utilizando-se o método de hidrólise enzimática, o número de fragmentos de insetos e de pelos de roedor encontrado é inferior ao obtido empregando o método da hidrólise ácida.

Aplicando-se o método da digestão com pancreatina, observa-se que, após a filtração do líquido extrator, resta muito amido no papel de filtro, o que dificulta a identificação das sujidades pesquisadas. No método da hidrólise ácida, a recuperação é maior, obtêm-se um papel mais limpo, sendo mais fácil a identificação, tanto dos fragmentos de insetos, como de pelos de roedor e de larvas de insetos. Talvez seja esta a causa de se obter menor contagem de sujidades quando se empregou o método de hidrólise enzimática do que quando foi utilizado o método de hidrólise ácida, visto que, em amostras-padrão contaminadas no laboratório e analisadas pelos dois métodos, a recuperação, tanto de fragmentos de insetos como de pelos de roedor e de larvas, foi igual em ambos.

O desenvolvimento do método da pancreatina é mais dispendioso devido ao preço da enzima, mais demorado, além do que exige a dedicação do analista durante toda a execução da análise. Utilizando-se o método da hidrólise ácida, o tempo empregado na execução da análise é menor, sendo que a fase de hidrólise é realizada em autoclave, poupando a ação do analista pelo menos na primeira etapa do processo.

Em ambos os métodos não foi notada alteração nos fragmentos de insetos e nos pelos de roedor, isto é, tanto a pancreatina, como o ácido clorídrico utilizados na hidrólise do macarrão não atacaram os fragmentos ou pelos, de modo a dificultar sua identificação ao exame microscópico estereoscópico.

Do método da hidrólise ácida pode ser excluída a fase da lavagem com detergentes, preconizada pela AOAC², porque o percolador fica bem limpo usando-se somente álcool etílico para retirar o óleo mineral.

Observou-se que o maior número de fragmentos de insetos foi encontrado em macarrão comum, tanto no analisado pelo método da hidrólise ácida como no submetido ao método da hidrólise enzimática; o maior número de amostras condenadas, contendo mais de 31 fragmentos de insetos em 225g de amostras pertenciam ao macarrão comum, em 80% das amostras em que foi utilizado o método da hidrólise ácida, e em 50% das amostras em que se usou o método da hidrólise enzimática.

Pelos de roedor foram encontrados em maior número de amostras de macarrão de sêmola (24%) quando se utilizou o método da hidrólise ácida e em maior número de amostras de macarrão com ovos (10%), quando foi utilizado o método da hidrólise enzimática.

Os números máximos de fragmentos de insetos encontrados foram 372 em macarrão comum e 345 em macarrão de sêmola, maiores que os encontrados por *Gecan & Atkinsons*⁷, e 282 em macarrão com ovos, menores que os encontrados pelos autores citados, embora a nossa amostragem fosse menor.

O número máximo de pelos de roedor encontrado foi 2 em macarrão de sêmola e em macarrão com ovos, menores que os encontrados por *Gecan e Atkinsons*⁷.

Levando em consideração o número de fragmentos de insetos, podemos verificar que o macarrão de sêmola e o macarrão comum são de qualidade inferior às do macarrão com ovos; e que o macarrão de sêmola apresentou maior contaminação com pelos de roedor, sendo 24% das amostras analisadas impróprias para o consumo pela presença dessa sujidade.

Se extrapolarmos o número de fragmentos de insetos que a legislação tolera de 100 gramas para 225 gramas de macarrão, que é a tomada de ensaio do método, o número de fragmentos de insetos seria 67,5 das 150 amostras analisadas pelo método de hidrólise ácida, somente 22% do total apresentaram número de fragmentos de insetos superior a 60.

Quanto à presença de ácaros, 2% das amostras de macarrão com ovos e 6% das amostras de macarrão de sêmola apresentaram ácaros mortos, quando submetidas ao método da hidrólise ácida, sendo portanto consideradas impróprias para o consumo, ao passo que o macarrão comum apresentou ausência dessa contaminação.

CONCLUSÕES

Analisando 150 amostras de massas alimentícias, a saber, 50 de macarrão comum, 50 de macarrão de sêmola e 50 de macarrão com ovos, empregando o método da digestão com pancreatina e o da hidrólise ácida, podemos concluir:

1. O método da hidrólise ácida é menos demorado, menos dispendioso e permite contagem maior de fragmentos de insetos e pelos de roedor
2. Tanto no método da hidrólise ácida como no da digestão com pancreatina, não há modificação significativa no aspecto, ao microscópio estereoscópico, dos fragmentos de insetos e pelos de roedor.

3. A fase de lavagem com detergente, descrita no método da hidrólise ácida original da AOAC, pode ser excluída, porque a limpeza com álcool etílico é suficiente para retirar o óleo mineral aderido ao percolador.
4. Sessenta e quatro por cento das amostras de macarrão com ovos, 60% das amostras de macarrão de sêmola e 50% das amostras de macarrão comum estavam de acordo com a legislação em vigor, quando se utilizou o método da digestão com pancreatina, e 52% das amostras de macarrão com ovos, 42% das amostras de macarrão de sêmola e 20% das amostras de macarrão comum obedeciam a legislação, quando se utilizou o método da hidrólise ácida; portanto, pelo método da hidrólise ácida houve maior índice de condenação.
5. Utilizando o método da hidrólise ácida, concluímos que 80% das amostras de macarrão comum estava em desacordo com a legislação, quando se tomou como parâmetro o número de fragmentos de insetos. Este foi o tipo de macarrão que apresentou pior qualidade.
6. Podemos propor que o número de fragmentos de insetos tolerado pela legislação passe a ser 30 em 225 g de macarrão, visto que 64% das amostras de macarrão com ovos, 30% das amostras de macarrão comum e 56% das amostras de macarrão de sêmola, correspondendo a 21,3%, 10,0% e 18,7% respectivamente do total de 150 amostras apresentaram de 0 a 30 fragmentos de insetos, quando analisadas pelo método da hidrólise ácida; portanto, 40% do total das 150 amostras estavam no limite proposto.
7. Sugerimos que seja mantida a legislação atual que exige ausencia de pelos de roedor, ácaros vivos e/ou mortos, insetos vivos e/ou mortos e larvas de insetos vivas e/ou mortas.

RIALA6/652

ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. – Comparison of methods for filth in alimentary pastes – *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):11-17, 1989.

ABSTRACT: Samples of three types of spaghetti, 50 units of wheat macaroni, 50 units of semolina macaroni and 50 units of egg macaroni, were examined for sanitary quality and for the comparison of acid hidrolisis method and pancreatin digestion method for light filth such as insect fragments, whole insects, insect larvae, mites, rodent hairs. The acid hidrolisis method seemed to be more sensitive for recovery of light filth; in 53 samples the counts of insect fragments was twice more than pancreatin method when the method employed was the acid hidrolisis method; and in 14 samples the counts of insect fragments were five times superior. The acid hidrolisis method is considerably less time consuming until the microscope results are available and results in filter papers clean, easy to examine; use more inexpensive and readily available reagents and the analyst is required in shorter time. It was suggested that the AOAC and AACC acid hidrolisis method be modified in the detergent wash step. Results showed that wheat flour macaroni samples were in a poorer quality than the semolina macaroni and egg macaroni in relation to insect fragments, the mostly encountered defect. It was suggested that the Brazilian legislation could tolerate up to 30 insect fragments per 225g of macaroni, since 40% of the 150 samples were in the limit of 30 insect fragments in 225g of sample. It was suggested that the legislation do not tolerate rodent hairs, mites alive or dead, whole insect alive or dead or insect larvae alive or dead.

DESCRIPTORS: pasta (macaroni), animal filth in, microscopical detection; pasta (macaroni), animal filth in, extraction; methods, acid hidrolisis, pancreatin digestion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8thed. St. Paul, Minnesota, A.A.C.C., 1983. v1 [A.A.C.C. method 28-32].
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984. p. 903. [Tecn. 44.069].
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984. p. 902. [Tecn. 44.064].
4. BRASIL. Leis, decretos etc. – Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11516. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativa a alimentos (e bebidas).
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. – Portaria nº 1, de 4 de abril de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 8 de abril de 1986. Seção I, p. 5039. Estabelece provisoriamente o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos a nível microscópico, em 100 (cem) gramas do produto... até que sejam concluídos os estudos de revisão da Resolução Nº 12/78 – CNNPA.
6. BRICKEY, P.M., JR.; GECAN, J.S.; THRASHER, J.J. & VASQUEZ, A.N. – Notes on microanalytical techniques in the analysis of foods for extraneous materials. *J. Assoc. off anal. Chem.*, **51** (4): 875-6, 1968.
7. GECAN, J.S. & ATKINSONS, J.C. – Microanalytical quality of macaroni and noodles - *J. Food Protec.*, **48** (5): 400-2, 1985.
8. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. – Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 24. Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (NTA 49).
9. TERBUSH, L.E. – The medical significance of mites of stored food. *FDA by lines*, **3** (2): 57-70, 1972.
10. THRASHER, J.J. – Collaborative study of acid autoclave method for mineral oil extraction of light filth from spaghetti and macaroni. *J. Assoc. off anal. Chem.*, **52** (3): 463-5, 1969.
11. ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. – Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **45** (1/2):13-20, 1985.
12. ZAMBONI, C.Q. & BATISTIC, M.A. – Verificação das condições higiênicas de biscoitos por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **45** (1/2):61-4, 1985.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1988.

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE PASTEURIZADO CONSUMIDO NA CIDADE DE SÃO PAULO*

Neusa Vitória V. SILVEIRA**
Harumi SAKUMA**
Marilda DUARTE**
Maria Auxiliadora B. RODAS**
Jacira H. SARUWTARI**
Elizabeth L. CHICOUREL**

RIALA6/653

SILVEIRA, N.V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H. & CHICOUREL, E. L. - Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 19-25, 1989.

RESUMO: Foram analisadas, quanto ao aspecto microbiológico e características físico-químicas e sensoriais, 430 amostras de leite pasteurizado, dos tipos A, B e C, de onze diferentes marcas comercializadas na cidade de São Paulo. No exame microbiológico, das 103 amostras de leite tipo A, 162 do tipo B e 165 do tipo C, 70,9%, 35,8% e 21,2%, respectivamente, estiveram fora dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor, do Ministério da Saúde. No exame físico-químico, das 103 amostras de leite tipo A, 162 do tipo B e 165 do tipo C, 68%, 80,2% e 17%, respectivamente, apresentaram teores de gordura em desacordo com os limites mínimos exigidos pela legislação do Ministério da Agricultura. Foi elevado o número de amostras que apresentou reação negativa de peroxidase, 52,5%, do tipo B e 50,9%, do tipo C.

DESCRITORES: leite (pasteurizado), qualidade de, na cidade de São Paulo, em relação à legislação brasileira.

INTRODUÇÃO

O leite é conceituado como um alimento saudável. Entretanto, é necessário um bom controle de qualidade para que seja um alimento indicado como primordial à saúde humana. Estatística publicada em literatura científica alerta sobre infecções adquiridas através do leite^{1,4}.

O leite oferece condições excelentes para a multiplicação de microrganismos, em curto espaço de tempo. A garantia de sua qualidade depende de vários fatores. O leite deve ser tirado de animais saudáveis, em local higienizado, por pessoal em boas condições de saúde. O material utilizado na ordenha deve seguir todas as regras legais do Ministério da Agricultura⁶. Nas usinas, o leite deve sofrer pasteurização adequada, e ser mantido sob refrigeração inferior a 10°C até entrega ao consumidor^{15,19}. Todos esses cuidados vão influen-

ciar na qualidade do produto final, tanto do ponto de vista microbiológico quanto na parte físico-química.

É necessário uma implantação de normas técnicas viáveis para que este produto chegue ao consumidor com a suas características garantidas. Os seus constituintes nutritivos são todos solúveis e, por isso, muito importantes na alimentação de crianças, anciões, convalescentes e desportistas.

Esta pesquisa pretende verificar a situação do leite, tipos A, B e C oferecidos no comércio de São Paulo e comparar os resultados com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira vigente. A proposta deste trabalho é apresentar avaliação sensorial, dados físico-químicos e microbiológicos, como uma contribuição aos serviços ligados à Saúde Pública.

* Realizado nas Seções de Laticínios e Microbiologia Alimentar, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P. Apresentado no 10º Congresso Nacional de Belo Horizonte, M.G., 1988.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas amostras de 1.000 ml de leite dos tipos A, B e C procedentes de diversas usinas de beneficiamento localizadas no Estado de São Paulo, distribuídas na Capital. As amostras foram adquiridas no comércio, transportadas em recipientes isotérmicos até o laboratório, e mantidas sob refrigeração até o início da análise, que ocorria dentro de, no máximo, duas horas. Foram coletadas 430 amostras de leite, sendo 103 do tipo A, 162 do tipo B e 165 do tipo C, e submetidas à avaliação sensorial, aos exames físico-químicos e microbiológicos.

Foi tomada uma alíquota de 100 ml de leite para exame microbiológico e, após a medida do volume restante e avaliação das suas características organolépticas, a amostra foi submetida aos exames físico-químicos. Foram realizadas as seguintes determinações microbiológicas, segundo a metodologia recomendada pela APHA²: contagem padrão em placas, pelo método de semeadura em profundidade em ágar-padrão, incubadas a 35°C, por 48 horas; determinação do número de microrganismos psicrófilos; determinação do número de microrganismos termófilos; determinação quantitativa de bactérias coliformes totais pelo método de fermentação em tubos múltiplos em caldo lactosado-bile-verde brilhante, a 2%, incubados à temperatura de 35°C, durante 24 a 48 horas, e de bactérias coliformes fecais, pelo método de fermentação em tubos múltiplos em caldo *Escherichia coli*, incubados a 45,5°C, em banho-maria, durante 24 a 48 horas (ambos os testes para bactérias coliformes foram completados por semeadura dos tubos positivos em ágar eosina - azul de metileno, segundo Levine, e o isolamento da colônia, em meio Rugai¹⁰, ágar e lactose); contagem de bolores e leveduras. As pesquisas, em 25 ml da amostra, de *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e de *Clostridium* sulfito redutor, a 46°C, foram realizadas segundo a metodologia recomendada pela APHA^{3,11}. A pesquisa qualitativa para *Salmonella* foi realizada pelo pré-enriquecimento de alíquotas de 25 ml da amostra de leite, nas quais foi colocado 0,1 ml de solução de verde-brilhante a 1:1.000 e o tubo foi incubado a 35°C, por 24 horas. Após a incubação, duas alíquotas de 1,5 ml cada foram transferidas para os meios de enriquecimento seletivos, em tubos contendo 20 ml de caldo selenito-cistina com novobiocina, e em caldo tetracionato segundo Kauffmann, e incubados a 42°C por 24 e 48 horas; após, o material foi semeado em placas com ágar verde-brilhante e ágar-salmonella-shigella, as placas incubadas a 35°C, durante 24 horas e as colônias suspeitas foram isoladas em meio de Rugai modificado¹⁴.

As análises físico-químicas foram realizadas pelos métodos oficiais exigidos pela legislação vigente^{7,21}. Foram efetuadas as seguintes determinações físico-químicas: acidez, pelo acidímetro de Dornic; densidade a 15°C, pelo termolactodensímetro de Quevenne, e gordura, pelo butirômetro de Gerber. Com os resultados dos teores de gordura e densidade, determinou-se o extrato seco total, através do disco de Ackermann. Pela subtração do teor de gordura do extrato seco total, obteve-se o extrato seco desengordurado. O índice de refração no soro cúprico foi determinado pelo refratômetro de imersão de Zeiss, a 20°C. Este conjunto de dados possibilitou verificar se o leite se encontrava dentro dos parâmetros normais para cada tipo. Para verificação de uma pasteurização dentro da temperatura adequada, foi efetuada a prova de peroxidase. Foi pesquisada a presença de formol, como conservador, pelos testes de floroglucina, do ácido cromotrópico e de fenil-hidrazina; e a presença de cloro livre pela formação de iodo livre, a partir do iodeto de potássio. O teste de alcalinidade foi realizado para detectar sais solúveis no leite, que são adicionados com a finalidade de corrigir o grau de acidez, quando alterado.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise físico-química, quanto aos parâmetros da legislação vigente⁵, estão relacionados na tabela 1. As amostras de leite, com volume abaixo de 1.000 ml, foram 133 (30,7%) e as com volume acima de 1.000 ml foram 151 (35,1%). As características organolépticas de todas as amostras de leite do tipo A encontravam-se normais. Em 11 (6,8%) amostras de leite do tipo B e em 20 (12,1%) amostras do tipo C foi constatado sabor anormal, sendo que em algumas havia odor desagradável. A pesquisa dos conservadores formol e cloro livre e a de substâncias alcalinas foram negativas em todas as amostras analisadas.

As determinações microbiológicas realizadas estão apresentadas nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. A pesquisa foi negativa para *Clostridium* sulfito redutor, a 46°C, e para *Salmonella*. Nenhuma das amostras de leite do tipo A analisadas apresentou *Staphylococcus aureus*. As amostras positivas para *S. aureus* do leite dos tipos B e C estão relacionadas com o teste de peroxidase (tabela 5).

TABELA 1

Análise físico-química de 430 amostras de leite tipos A, B e C coletadas na cidade de São Paulo, no período de agosto de 1987 a setembro de 1988

(Continua)

TIPOS DE LEITE	AMOSTRAS Nº	VOLUME				ACIDEZ				DENSIDADE A 15°C				GORDURA			
		ml		Amostras n° (%)		°Dornic		Amostras n° (%)		-		Amostras n° (%)		g/100g		Amostras n° (%)	
		Máximo	Mínimo	A*	D**	Máximo	Mínimo	A	D	Máxima	Mínima	A	D	Máximo	Mínimo	A	D'
A	103	1,085	920	85 (82,5)	18 (17,5)	18,40	13,93	74 (71,8)	29 (28,2)	1,0336	1,0294	103 (100,0)	0 (0)	4,1	2,7	33 (32,0)	70 (68,0)
B	162	1,090	940	103 (63,6)	59 (36,4)	17,41	12,38	115 (71,0)	47 (29,0)	1,0348	1,0296	156 (96,3)	6 (3,7)	4,2	2,9	32 (19,7)	130 (80,3)
C	165	1,095	950	109 (66,1)	56 (33,9)	18,00	11,94	102 (61,8)	63 (38,2)	1,0346	1,0300	156 (94,5)	9 (5,5)	3,7	2,7	137 (83,0)	28 (17,0)

(Conclusão)

TIPOS DE LEITE	AMOSTRAS Nº	EXTRATO SECO TOTAL				EXTRATO SECO DESENGORDURADO				REFRAÇÃO NO SORO CÚPRICO A 20°C				PEROXIDASE	
		g/100g		Amostras n° (%)		g/100g		Amostras n° (%)		°Zeiss		Amostras n° (%)		Amostras n° (%)	
		Máximo	Mínimo	A*	D**	Máximo	Mínimo	A	D	Máximo	Mínimo	A	D	A	D
A	103	13,40	11,35	73 (70,9)	30 (29,1)	9,50	8,09	97 (94,2)	6 (5,8)	38,8	36,2	97 (94,2)	6 (5,8)	98 (95,1)	5 (4,9)
B	162	13,40	11,42	130 (80,3)	32 (19,7)	9,70	8,33	158 (97,5)	4 (2,4)	40,0	36,4	150 (92,6)	12 (7,4)	77 (47,5)	85 (52,5)
C	165	13,08	11,18	143 (86,7)	22 (13,3)	9,87	8,44	148 (89,7)	17 (10,3)	41,3	36,0	152 (92,1)	13 (7,9)	81 (49,1)	84 (50,9)

* A = De acordo com as normas legais vigentes.

** D = Em desacordo com as normas legais vigentes.

SILVEIRA, N.V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H. & CHICOURIEL, E.L. - Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 19-25, 1989.

TABELA 2

Percentagem de leite tipos A, B e C, com suas contagens de microrganismos psicrótróficos

Tipos de Leite	A	B	C
	Amostras n ^o (%)	Amostras n ^o (%)	Amostras n ^o (%)
0	92 (89,3)	141 (87,0)	143 (86,7)
10 ⁴	9 (8,7)	15 (9,2)	15 (9,0)
10 ⁵	zero	2 (1,3)	2 (1,2)
≥ 10 ⁶	2 (1,9)	4 (2,5)	5 (3,0)

TABELA 3

Percentagem de leite tipo A, B e C, com suas contagens de microrganismos termófilos

Tipos de Leite	A	B	C
	Amostras n ^o (%)	Amostras n ^o (%)	Amostras n ^o (%)
0	103 (100)	158 (97,5)	144 (87,3)
10 ²	zero	1 (0,6)	11 (6,6)
10 ³	zero	3 (1,8)	10 (6,0)

TABELA 4

Percentagem de amostras de leite tipos A, B e C, positivas para B. cereus

Tipos de leite	Contagem de <i>B. cereus</i> (UFC/ml)	Percentagem de amostras
A	1,5 x 10 ² a 4 x 10 ²	1,9
B	50 a 5 x 10 ²	13,5
C	80 a 9 x 10 ²	13,3

TABELA 5

Leite pasteurizado tipos B e C e contagem de S. aureus em relação ao teste de peroxidase

Tipos de leite	Contagem de <i>S. aureus</i> (UFC/ml)	Teste de peroxidase
C	2,4 x 10 ³	+
C	7,5 x 10 ²	-
C	80	-
C	3,0 x 10 ³	+
C	1,9 x 10 ²	+
C	9,2 x 10 ²	-
C	5,7 x 10 ²	-
C	6,0 x 10 ²	-
B	5,6 x 10 ²	-
B	2,2 x 10 ³	-

UFC = Unidade formadora de Colonia.

(+) = Positivo; (-) = Negativo.

TABELA 6

Percentagem de amostras de leite tipo A, B e C, positivas para bolores

Tipos de leite	Contagem de bolores (UFC/ml)	Percentagem de amostras
A	6 a 16	1,9
B	5 a 90	1,8
C	5 a 8	1,2

TABELA 7

Percentagem de amostra de leite tipos A, B e C, positivas para leveduras

Tipos de leite	Contagem de leveduras (UFC/ml)	Percentagem de amostras
A	7 a 6×10^2	7,7
B	5 a $3,3 \times 10^2$	10,5
C	8 a $1,2 \times 10^2$	9,0

DISCUSSÃO

Na contagem padrão em placas, na pesquisa de coliformes totais, e na de coliformes fecais, as amostras estiveram fora das normas legais vigentes. Os dados microbiológicos indicaram grande ocorrência de amostras de leite tipo A fora dos padrões, o que não ocorreu com as amostras de leite tipos B e C. Este fato pode ser atribuído à tolerância da legislação quanto aos limites para o leite, tipos B e C. A elevada ocorrência das amostras de leite dos tipos B e C fora dos padrões pode ser atribuída à possível falha na pasteurização, contaminação após pasteurização, ou na conservação em temperatura inadequada.

As bactérias psicrotóxicas, ao nível de 1×10^4 por ml, podem vir a produzir de 10 ou mais unidades de proteases termocastáveis, responsáveis pelo cheiro e sabor desagradáveis, e coagulação do produto, encurtando a vida útil do mesmo¹. BARUFFALDI et alii⁴ constataram a contagem de psicrotóxicos por ml, ao nível de 1×10^4 microrganismos, em 35% das amostras de leite tipo B, analisadas no período de fevereiro a agosto de 1982. No presente trabalho, 10,6% das amostras de leite tipo A, 13,0% das do tipo B e 13,2% das do tipo C apresentaram nível de microrganismos psicrotóxicos igual ou maior que 10^4 , tornando mais curta a vida útil desses produtos.

A presença de *Staphylococcus aureus* foi verificada em 1,8 e 4,8% das amostras de leite, dos tipos B e C, respectivamente.

CERQUEIRA-CAMPOS et alii⁸ verificaram a presença de *S. aureus* em 5 (8,3%) das 60 amostras de leite pasteurizado teor de gordura 3,2%, pesquisadas em 1984.

BARUFFALDI et alii⁴ constataram a presença de *S. aureus* em 17,5% do total das amostras de leite pasteurizado, tipo B, analisadas, e 14,8% das amostras de leite pasteurizado teor de gordura 3,2%, analisadas no período de setembro a dezembro de 1982¹⁵.

A presença de cepas de *S. aureus*, possivelmente resistentes à pasteurização, foi verificada em 5 das 8 cepas isoladas de leite tipo C e em 2 cepas isoladas de leite tipo B, em que o teste de peroxidase deu resultado negativo.

O leite pasteurizado permite o crescimento e produção de enterotoxina pelo *S. aureus*¹⁰, a temperatura igual ou maior que 20°C¹⁰.

Na variação do volume da amostra de leite constatou-se fraude, principalmente em duas marcas de leite do tipo C. A observação das características organolépticas é um dado capaz de, isoladamente ou pelo seu conjunto, denunciar condições higiênicas insatisfatórias e alterações físico-químicas do leite. O sabor é o fator de

qualidade que mais influencia na satisfação do consumidor. No aspecto geral, o leite deve apresentar coloração própria e viscosidade característica⁹. O cheiro de leite limpo, embora quase imperceptível, é característico. O cheiro de estábulo no leite é indicação de ordenha sem higiene, em local sujo, ou de leite contaminado¹⁹. O mesmo se pode dizer do sabor. Cheiro não característico pode ocorrer com o leite que apresenta contagem de bacilos Gram-negativos de 5×10^6 a 10^8 . No leite pasteurizado é difícil precisar a origem de alterações das características organolépticas mas, sem dúvida, sua ocorrência indica anormalidade^{13,20}. A análise físico-química do leite permite uma apreciação geral sobre sua integridade. A baixa acidez encontrada em 139 (32,0%) das amostras sugere adição de água, ou leite de vaca com mastite¹⁷. A densidade do leite é resultante das densidades de seus componentes, da quantidade da gordura e do nível de hidratação das proteínas; entretanto, sabe-se, que com dupla fraude, retirada de gordura e adição de água convenientemente calculada, consegue-se mantê-la normal^{12,17}. Das amostras analisadas, 15 apresentaram densidade fora da legislação vigente. A gordura do leite é responsável pelo sabor agradável, biologicamente superior às demais gorduras conhecidas¹⁶, por ser veículo de vitaminas A, D e E. Um número muito alto de amostras apresentou teor de gordura abaixo do limite mínimo exigido pelas normas legais⁶. A determinação do extrato seco total mostrou um percentual elevado de amostras fora do padrão legal⁶, resultante dos baixos teores de gordura encontrados. Os teores de extrato seco desengordurado abaixo do percentual exigido na legislação indicam uma possível diluição do produto. O índice de refração no soro cúprico resultou abaixo da exigência mínima legal em 31 (7,2%) das amostras analisadas. Esses dados, simultaneamente com acidez abaixo de 15^oD, indicam, com bastante segurança, a falsificação mais comum nesse tipo de alimento, ou seja, a adição de água¹⁷. O teste de peroxidase foi negativo para um elevado número de amostras, o

que indica que esses leites foram aquecidos acima de 84^oC, provavelmente para reduzir a carga microbiana presente. Não foi constatada a presença de formol, cloro livre ou de substâncias alcalinas em todas as amostras analisadas.

CONCLUSÃO

Pela quantidade de amostras em desacordo com os padrões legais, são insatisfatórias as condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. Uma vez que as cepas de *S. aureus* encontradas são potencialmente capazes de produzir enterotoxinas deletérias ao consumidor, deveriam estar ausentes no leite pasteurizado. Os resultados do presente trabalho sugerem a necessidade de uma constante e efetiva fiscalização do produto nos locais de venda ao consumidor.

A atuação dos órgãos responsáveis pela saúde pública que, direta ou indiretamente, exercem o controle de qualidade dos alimentos, poderia ser mais eficiente se a legislação fosse revisada. São necessários estudos da realidade nacional para adequação e atualização da legislação vigente⁶.

Para uma melhor avaliação físico-química do leite, sugere-se acrescentar à legislação vigente a exigência de dosagem de proteínas totais.

A grande quantidade de amostras encontradas com teor de gordura abaixo do exigido pela legislação⁶ é uma constatação relevante. Visto tratar-se de um componente de extrema importância neste alimento básico, sugere-se o aperfeiçoamento da legislação, no sentido de tornar possível a condenação de uma amostra, unicamente pela verificação de fraude no teor de gordura.

Agradecimentos

A Laura Maria Vendl, Carmen Tiyoko Maki-gusa e Míriam Mitsue Hoshiko, pela colaboração técnica do presente trabalho.

RIALA6/653

SILVEIRA, N.V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H. & CHICOUREL, E. L. - Evaluation of physicochemical and microbiological quality of pasteurized milk consumed in São Paulo City. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 19-25, 1989.

ABSTRACT: Microbiological, physicochemical and sensorial characteristics were checked through the analysis of 430 samples of types A, B and C of eleven different brands of pasteurized milk regularly sold in the city of São Paulo. The microbiological analysis showed that 70,9% of 130 samples of type A milk; 35,8% of 162 samples of type B milk; and 21,2% of 165 samples of type C milk respectively did not comply with legal standards established by the Brazilian Ministry of Health. By the physicochemical analysis 68,0% of 130 samples of type A milk; 80,2% of 162 samples of type B milk; and 17,0% of 165 samples of type C milk presented lipid content below the minimum limits required by the Brazilian Ministry of Agriculture. The number of samples presenting negative peroxidase was excessively high: 52,5% of type B milk and 50,9% of type C milk.

DESCRIPTORS: milk (pasteurized), quality of, in São Paulo City, in relation to Brazilian regulation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.M.; BARACH, J.T. & SPECK, M.L. - Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.*, 58 (6): 828-34, 1975.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - *Standard methods for the examination of dairy products*. 15th ed. Washington, D.C., APHA, 1985, p. 133; 173.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods - *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2nd ed. Washington, APHA, 1984, p. 62; 80; 197; 265; 286; 411; 458; 483.
4. BARUFFALDI, R.; VESSONI PENNA, T.C.; MACHOSVILI, I.A. & ABE, L.E. - Condições higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipo B vendido na cidade de São Paulo, S.P., no período de fevereiro a agosto de 1982. *Rev. Saúde públ.*, 18(5): 367-74, 1984.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 01 de 28 de janeiro de 1987 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial*, Brasília, 12 de fevereiro de 1987. Seção I, p. 2197. Aprova os padrões microbiológicos para os produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo...
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (aprovado pelo Decreto 30.691 de 28.03.52, alterado pelo Decreto 1.255 de 25.06.62). Brasília, Ministério da Agricultura, 1980, p.92; 126.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal - *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos*. Brasília, 1981, p. XIV - 10.
8. CERQUEIRA-CAMPOS, M.L.; IARIA, S.T. & FURLANETTO, S.M.P. - Grupos de microrganismos em amostras de leite pasteurizado, vendido na cidade de São Paulo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9º, CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12º, São Paulo, 1983. *Programa e resumos*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983, p.146.
9. DAVIDSON, J.H.; SENIK, G.F. & BANDLER, D.K. - Study of milk handling and milk quality in New York State public schools. *Dairy Food Sanit.*, 8(5): 236-42, 1988.
10. DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E. & BLECK, L.A. - Production of enterotoxin A in milk. *Appl. Microbiol.*, 16:917-24, 1968.
11. ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. Division of Microbiology - *Bacteriological analytical manual*. 6th ed. Arlington, V.A., A.O.A.C., 1984, p. 4.01; 5.01; 7.01; 14.01; 16.01; 17.01; 19.01.
12. MARTINS, J.F.P.; BALDINI; V.L.S.; FIGUEIREDO, I.B. & FERNANDES, A.G. - Qualidade do leite da bacia leiteira de Campinas: composição centesimal do leite para fins de processamento de queijo. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 18(1): 85-97, 1988.
13. MARTINS, J.F.P. - Qualidade do leite para processamento de queijos. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 16(4): 349, 1979.
14. MILK - with care. *Lancet*, 1 (8594): 1086, 1988.
15. PENNA, T.C.V.; BARUFFALDI, R. & COLOMBO A.J. - Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 6(1): 57-74, 1986.
16. PESSOA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. - Meios de Rugai e Lisina-motilidade, combinados em um só tubo para identificação presumtiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 97-100, 1972.
17. ROSELL, J.M. & SANTOS, I. - *Métodos analíticos de laboratorio lactológico y microbiologia de las industrias lácteas: procedimiento de análisis e investigações...* Barcelona, Labor, 1952. Tomo I; p. 39; 65; 73; 147.
18. RUGAI, E. & ARAÚJO, A. - Meio de cultura para identificação presumtiva de bacilos intestinais Gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 79-83, 1968.
19. SÁ, F.V. - *O leite e seus produtos*. 4ª edição. Lisboa, Livr. Clássica, 1978, p. 44 (Coleção Técnica Agrária).
20. SANTOS, E.C. - Qualidade dos produtos lácteos postos à disposição no mercado consumidor. *Rev. ILCT*, 37:27-30, 1982.
21. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V.1. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, 1985. p. 199;201; 204; 205; 207; 218; 219; 223; 270.

E R R A T A

Pág. 19, coluna 2, 12ª linha,
onde se lê... São Paulo...
leia-se ... São Paulo, no período de 1º de outubro de 1987
a 30 de setembro de 1988, e comparar ...

RESÍDUOS TÓXICOS EM CÂNULAS E SERINGAS ESTERILIZADAS E REESTERILIZADAS COM ÓXIDO DE ETILENO

Maria Helena NOGUEIRA **
Maria do Carmo Q. AVELAR ****
Heloisa H.C. BARRETTO***
Dilma P.A. CARDOSO**

RIALA6/654

NOGUEIRA, M.H.; AVELAR, M.C.Q.; BARRETTO, H.H.C. & CARDOSO, D.P. A. - Resíduos tóxicos em cânulas e seringas esterilizadas e reesterilizadas com óxido de etileno, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1): 27-34, 1989.

RESUMO: Vinte e três amostras compostas por 8 cânulas de borracha e de plástico e 5 seringas de plástico de diversos tamanhos, reprocessadas algumas em até vinte vezes, foram analisadas quanto aos resíduos de óxido de etileno e seus produtos de reação, etilenocloridrina e etilenoglicol, que poderiam permanecer após o processo de aeração. Os valores encontrados foram comparados com os estabelecidos pela legislação brasileira e mostraram que a reesterilização não acarretou acúmulo das substâncias nos materiais, com exceção das seringas de plástico de 1 ml.

DESCRITORES: esterilização de cânulas e seringas; óxido de etileno, resíduos, em cânulas e seringas reesterilizadas com; cânulas (borracha, plástico); seringas (plástico).

INTRODUÇÃO

O óxido de etileno é uma substância gasosa que vem sendo muito usada nos últimos anos, em hospitais, por suas propriedades esterilizantes, exercendo ação bactericida, fungicida, virucida, esporicida. Sua eficácia tem sido confirmada por muitos investigadores e seu uso tornou-se universal, principalmente levando-se em conta a sua alta difusibilidade e permeabilidade no material. Uma enorme variedade de artigos pode ser esterilizada, sem qualquer dano, em seus invólucros finais onde o gás se difunde com facilidade, e liberta-se rapidamente, deixando poucos resíduos^{4,9}. Entretanto, devido a sua toxicidade, mesmo a baixas concentrações, torna-se necessário o seu controle, bem como o de seus produtos de reação que podem estar presentes nos materiais em que foi aplicado.

Atualmente, em virtude da sua termolabilidade, numerosos instrumentos, equipamentos e acessórios médico-cirúrgicos de centros hospitalares são processados com óxido de etileno (OET) nos centros de esterilização^{1,2}.

A esterilização pelo OET é substancialmente mais complexa que pelos processos usuais. Esta complexidade resulta das variáveis do processo, incluindo temperatura, umidade, tempo de exposição, concentração do gás, tipo de material e acondicionamento e carregamento da esterilizadora^{4,6,19}. A sua difusão em certos materiais, como tecidos, plásticos, pós e principalmente borrachas, depende da espessura dos mesmos e de como são embalados.

Atenção especial deve ser dirigida aos materiais susceptíveis a absorção e dessorção do

* Realizado no Centro de Material Esterilizado da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP, e na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 38º Congresso Brasileiro de Enfermagem, Rio de Janeiro, 1986.

** Da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

*** Do Instituto Adolfo Lutz.

**** Da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, SP.

OET. Materiais plastificados e de borracha⁹, esterilizados com esse composto, devem ser submetidos a um tratamento especial devido à grande solubilidade do gás.

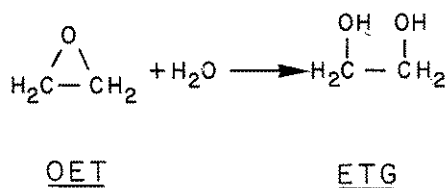
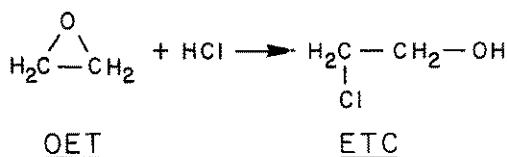
Por esta razão, após a esterilização, todos os artigos devem ser aerados o suficiente para permitir a saída de qualquer resíduo, sendo que um período de aeração de seis horas é usualmente satisfatório; materiais mais densos podem necessitar de até 24 horas de aeração. Segundo GUNTER⁹, uma aeração forçada a 50°C, por 8 horas, removerá rapidamente o OET residual, permitindo utilizar todos os materiais esterilizados.

O OET residual e seus produtos de reação, como etilenocloridrina (ETC) e etilenoglicol (ETG), são altamente irritantes para os tecidos, provocam hemólise, inflamação e até mesmo necrose das mucosas pelo uso de sondas endotraqueais, queimaduras da face pelo uso de máscaras de anestesia, queimaduras dos pés e das mãos pelo uso respectivo de botas e luvas de borracha, quando tais tipos de materiais não sofreram o processo de aeração por tempo suficiente^{7,13,14,17,18,19}.

O trabalho de MARSHALL et alii¹¹ demonstra o desenvolvimento de reações alérgicas em pacientes sensibilizados pelo uso repetido de material esterilizado com OET.

Estudos indicam um potencial de risco mutagênico e carcinogênico associado à exposição ocupacional ao OET^{2,5,10,14,15}.

O ETC é formado pelo OET na presença de íons cloreto e o ETG é formado lentamente pela combinação de OET com água, como mostram as reações abaixo:



Os riscos decorrentes do uso do gás OET como agente esterilizante advêm de um complexo de circunstâncias, sendo as mais comuns a inobservância de padrões técnicos e de segurança, relacionados com a sua toxicidade.

Se de um lado a eficácia do processo de esterilização com o uso do gás OET é uma certeza vivenciada em cinco anos de trabalho testado e verificado, através de métodos preconizados por especialistas no assunto, de outro para a incerteza da inocuidade dos resíduos em certos tipos de materiais, especialmente os de plástico e de borracha.

Dúvidas persistentes sobre os riscos inerentes ao processo levou a iniciar o presente trabalho com a finalidade de determinar a presença desses compostos em cânulas endotraqueais e seringas, após aeração forçada na câmara esterilizadora, com os objetivos de verificar: a) se o tempo de aeração previsto é suficiente para a remoção dos resíduos tóxicos do OET e de seus produtos de reação - ETC e ETG, de maneira a não ultrapassarem limites máximos estabelecidos pela legislação em vigor³; b) se a reesterilização repetida nos referidos materiais não provoca maior retenção das quantidades desses resíduos tóxicos, permitindo a sua reutilização.

A escolha do tipo de material recaiu sobre os mais críticos por sua maior intimidade com camadas de tecidos mais sensíveis, como a mucosa traqueal e outros tecidos biológicos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estabelecidas duas etapas de trabalho: a primeira relacionada com o processo de esterilização e a outra com a análise de resíduos no material.

Esterilização

Material

6 cânulas endotraqueais, para adulto, de borracha com *cuff* com calibres (FR) e pesos respectivos de 5,0-11,5 g; 6,0-13,0 g; 6,5-17,5 g; 7,0-19,0 g; 7,5-21,0 g e 9,5 - 34,4 g;

12 cânulas endotraqueais de plástico, para adulto, com *cuff* com calibre 6 FR cânulas endotraqueais de plástico, uso infantil, sem *cuff*, peso 20 g;

5 seringas de plástico, com capacidade de 1; 3; 5; 10 e 20 ml, previamente esterilizadas pelo fabricante.

Método

A esterilização foi realizada em autoclave vertical, com capacidade de 0,603m³, contendo 3 cestos (inferior, médio e superior) onde os materiais foram colocados. A temperatura foi de 60°C, mantida constante no decorrer do processo com o auxílio de um termostato. A estabilização foi atingida após 1 hora. Em seguida, foi promovido vácuo inicial durante 30-40 minutos, até atingir 600 mmHg. No interior da câmara, a umidade relativa foi de 40%. O gás OET foi introduzido sob pressão de 1kg/cm², na mistura de 12% OET e 88% Diclorofluorometano⁴.

A concentração da mistura dos gases era de 760 mg/l e sua penetração foi feita por 20 minutos. Tanto o gás como o ar foram aquecidos previamente antes de entrarem na câmara. O tempo de exposição do material ao gás foi de 5 horas e, ao fim do período de contato, foi feita a exaustão a vácuo. Após este tempo, promoveu-se a aeração forçada, com ar ambiental pré-aquecido e filtrado, durante 5 horas, à temperatura de 60°C⁴. O material foi então removido da autoclave e conduzido ao local da aeração, onde permaneceu por 12 horas à temperatura ambiente (25°C) e ventilação leve. Findo este período, foi submetido a análise.

Para controlar a eficiência da esterilização, utilizou-se como teste o indicador biológico (suspensão de esporos de *Bacillus subtilis*, variedade *globigii*). Após a esterilização, o material de teste foi submetido a análise microbiológica, conforme o "Manual de Controle de Infecção Hospitalar"⁴, e obtidos resultados negativos.

Em cada esterilização foram incluídas seis cânulas endotraqueais de borracha, distribuídas duas a duas em cada cesto, estando uma delas com *cuff* insuflado; seis cânulas de plástico distribuídas da mesma maneira anterior e 5 seringas plásticas de capacidade 1; 3; 5; 10 e 20 ml, distribuídas em cada cesto. Tanto as cânulas quanto as seringas foram marcadas para que se mantivessem na mesma posição nos cestos inferior, médio e superior dentro da câmara esterilizadora, durante o estudo.

Análise dos resíduos

Material e reagentes

Água bidestilada, desmineralizada e fervida durante 30 minutos.

Provetas de 100 ml com tampa

Tubos de vidro com tampa recoberta internamente por Teflon

Equipamento e acessórios

Gromatógrafo a gás, Varian 1440, equipado com detector de ionização de chama.

Coluna de aço inox de 2 m de comprimento, 1/8 pol. de diâmetro interno, com fase estacionária Porapak Q, numa temperatura de 130°C; temperatura do detector, 160°C e do vaporizador, 150°C.

Coluna espiralada para pesquisa de ETC e ETG, com 2 m de comprimento e 1/8 pol. de diâmetro interno, com fase estacionária Carbowax 600, numa temperatura de 100°C para ETC e 160°C para ETG; temperatura do detector, 180°C e do vaporizador, 170°C.

Gás de arraste: nitrogênio com velocidade de 30 ml/min

Extração

As cânulas foram colocadas separadamente em provetas de 100 ml. Em cada uma delas foram colocados 10 ml de água que foram agitados durante uma hora, de modo que a água passasse pela parte interna e externa das mesmas. A água foi retirada e passada novamente 5 vezes por cada uma delas, com a ajuda de uma pipeta Pasteur; após, foi transferida para tubos de vidro e injetados 5 µl no cromatógrafo. Repetiu-se o processo para as seringas, adicionando-se o volume de água correspondente à sua capacidade. Para as seringas de 20 ml, foram adicionados 10 ml de água e agitados durante uma hora; a água foi recolhida em tubos de vidro e 5 µl foram injetados no cromatógrafo.

A identificação dos picos das substâncias detectadas através do cromatograma foi feita pela comparação das distâncias de retenção com padrões submetidos às mesmas condições de análise e a determinação quantitativa foi feita pela comparação das áreas dos picos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de resíduos de OET, ETC e ETG encontrados nos materiais analisados, após o processo de esterilização pelo gás OET, foram comparados com os estabelecidos pela legislação brasileira em vigor³.

Os dados obtidos, resultantes das análises feitas por cromatografia gasosa, estão distribuídos nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

A precisão na medida dos dados resulta do nível de sensibilidade do aparelho. Algumas medidas detectadas nos resíduos de ETC e ETG, como 0,1 µg/g (ppm), e nos resíduos de OET, como

10 µg/g (ppm), representam a menor dosagem possível.

As tabelas 2 e 4 mostram que não houve diferença significativa nos resultados das análises realizadas nas amostras das cânulas de borracha, no 1º, 5º e 10º processos de esterilização, e nas das cânulas de plástico de uso infantil sem *cuff*, no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º processos de esterilização, ficando os valores entre 10 e 0,1 µg/g (ppm),

respectivamente para OET e ETC/ETG. Isto leva a acreditar que os resíduos dos gases esterilizantes se dissipam igualmente em ambas as cânulas, na mesma velocidade, num determinado período de tempo.

Nas cânulas de borracha, os níveis de resíduos detectados nas análises após o 15º e o 20º processos de esterilização são iguais em todas as amostras, ou seja, OET 10µg/g (ppm) e ETC/ETG 0,1 µg/g (ppm) conforme a tabela 2.

TABELA 1

Concentrações de OET, ETG e ETC (µg/g) presentes em seringas, de acordo com o número de esterilizações e posições no cesto da esterilizadora

Seringas (capacidade) ml	Nº de esterilizações	Cesto								
		Superior			Médio			Inferior		
		OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG
1	1	10	< 0,1	< 0,1	10	< 0,1	< 0,1	30	< 0,1	< 0,1
	3	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	20	< 0,1	< 0,1
	5	20	< 0,1	< 0,1	30	< 0,1	< 0,1	50	< 0,1	< 0,1
3	1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	10	< 0,1	< 0,1
	3	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
5	1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	3	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	10	< 0,1	< 0,1	20	< 0,1	0,2	30	< 0,1	0,1
10	1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	3	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	20	< 0,1	< 0,1	20	< 0,1	< 0,1	30	< 0,1	< 0,1
20	1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	3	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	< 10	< 0,1	< 0,1	10	< 0,1	< 0,1	30	< 0,1	< 0,1

TABELA 2

Concentrações de OET, ETC E ETG ($\mu\text{g/g}$) presentes em cânulas endotraqueais de borracha, de acordo com o número de esterilizações e posições no cesto da esterilizadora

Cânulas	Nº de esterilizações	Cesto								
		Superior			Médio			Inferior		
		OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG
Com cuff insuflado	1	< 10	0,1	0,1	< 10	0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	< 10	< 0,1	0,1	< 10	< 0,1	0,1	< 10	< 0,1	0,1
	10	< 10	< 0,1	0,3	< 10	< 0,1	0,3	< 10	< 0,1	0,3
	15	10	< 0,1	1,0	10	< 0,1	1,0	10	< 0,1	1,0
	20	10	< 0,1	1,0	10	< 0,1	1,0	10	< 0,1	1,0
Sem cuff insuflado	1	< 10	< 0,1	0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	10	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	15	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	20	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1

TABELA 3

Concentrações de OET, ETC E ETG ($\mu\text{g/g}$) presentes em cânulas endotraqueais de plástico com Cuff de acordo com o número de esterilizações e posições no cesto da esterilizadora

Cânulas	Nº de esterilizações	Cesto								
		Superior			Médio			Inferior		
		OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG
Com cuff insuflado	1	100	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	< 0,1	500	< 0,1	< 0,1
	2	100	< 0,1	< 0,1	90	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	< 0,1
Sem cuff insuflado	1	100	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	< 0,1
	2	100	< 0,1	< 0,1	100	< 0,1	< 0,1	30	< 0,1	< 0,1

TABELA 4

Concentrações de OET, ETC e ETG ($\mu\text{g/g}$) presentes em cânulas endotraqueais de plástico infantis sem cuff de acordo com o número de esterilizações e posições no cesto de esterilizadora

Cânulas	Nº de esterilizações	Cesto								
		Superior			Médio			Inferior		
		OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG	OET	ETC	ETG
Sem cuff	1	< 10	< 0,1	0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	2	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	3	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	4	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1
	5	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1	< 10	< 0,1	< 0,1

Comparados com os resultados das análises das amostras das cânulas de borracha com cuff insuflado e desinsuflado no decorrer do processamento da esterilização, os níveis de concentração de resíduos obtidos foram muito próximos. Comportamento idêntico foi detectado nas cânulas de plástico (tabelas 2 e 3).

Os materiais submetidos a inúmeras esterilizações (cânulas endotraqueais de borracha, vinte processos; cânulas de plástico de uso infantil, cinco processos), apresentaram como resultado concentrações dos resíduos sensivelmente constantes para ambos, sem efeito cumulativo (tabelas 2 e 4).

Para as cânulas endotraqueais de plástico, com cuff, foi planejado o número de cinco processos de esterilização; no entanto, a partir da 2ª esterilização, o material não resistiu. Paralelamente foi observado que os teores dos resíduos do OET detectados estavam comparativamente elevados, isto é, de 100 a 500 $\mu\text{g/g}$ (ppm), de acordo com a tabela 3. Os fatos referidos levaram a descartar a possibilidade de sua reutilização e não prosseguir com o estudo das mesmas.

Foi observado que os cromatogramas resultantes das análises das cânulas de borracha, após a 15ª esterilização, apresentavam um componente não identificado, ao lado da constatação dos resíduos de OET, ETC e ETG.

Tendo em conta as diferentes capacidades das amostras de seringas em estudo, observa-se na tabela que não houve variação considerável na maioria dos resultados encontrados. O teor dos resíduos de ETC e ETG permaneceu constante no total das amostras analisadas. Cabe destacar que a quantidade de resíduos de OET teve uma variação entre 10 até 50 $\mu\text{g/g}$ (ppm), sendo que as

quantidades mais elevadas foram detectadas, nas seringas de 1 ml de capacidade, fazendo crer numa dificuldade de aeração eficiente inerente à sua menor capacidade (tabela 1).

Observa-se que o posicionamento das seringas, de diferentes capacidades, nos cestos superior, médio e inferior, influi na retenção de maior ou menor quantidade do resíduo de OET. Em 47% das amostras posicionadas no cesto inferior resultaram quantidades mais elevadas de resíduo, variando entre 10 a 50 $\mu\text{g/g}$ (ppm) (tab. 1). A causa dessa elevação, nas amostras dos cestos inferiores pode ser explicada como consequência da quantidade elevada do gás recebido, por estarem próximos da entrada do OET na câmara esterilizadora.

Para os resíduos de ETC e ETG, a distribuição dos valores encontrados nas amostras permaneceram sem variações ou seja 0,1 $\mu\text{g/g}$ (ppm) independentes de sua posição nos cestos.

O número de esterilizações somado ao posicionamento das amostras nos cestos das esterilizadoras influenciaram a retenção de resíduos, pois 80% das amostras das seringas de diferentes capacidades posicionadas no cesto inferior, no 5º processo de esterilização, mostraram elevações significativas do teor dos resíduos, OET, 30-50 $\mu\text{g/g}$ (ppm) apresentadas (tabela 1).

Nas demais amostras da 1ª e 3ª esterilizações, posicionadas nos cestos superior e médio, os níveis dos resíduos permaneceram constantes.

CONCLUSÕES

A esterilização gasosa com OET pode ser aplicada com sucesso, salvo com pequenas restrições, para os materiais incluídos neste estudo.

Não houve efeito cumulativo no transcorrer do processo de reesterilização de todos os materiais, com excessão das seringas de plástico, com 1 ml de capacidade. Por esse motivo, estas devem ser descartadas após o primeiro uso e não devem sofrer o reprocessamento, nas condições desse estudo.

Como foram observados teores de resíduos mais elevados nas seringas de 3; 5; 10 e 20 ml com relação à posição no cesto inferior, ficou estabelecido que a esterilização das mesmas se deve processar, acondicionando-as obrigatoriamente no cesto superior e médio da esterilizadora vertical.

Podemos assinalar que, nas condições do presente trabalho, os níveis detectados nas amostras de seringas estudadas são compatíveis com os limites máximos permitidos pela legislação brasileira vigente, e recomendados por órgãos internacionais^{1,9,10}, excetuando aqueles resultantes da 5ª esterilização das amostras colocadas no cesto inferior.

As ocorrências que se verificaram no estudo das cânulas endotraqueais de plástico para uso em adulto, com *cuff*, anulam a possibilidade da sua reutilização, mas as cânulas endotraqueais de borracha podem ser reutilizadas até a 20ª reesterilização sem problemas residuais.

O posicionamento das cânulas endotraqueais de borracha e das de plástico para uso infantil nos cestos da esterilizadora não influenciou na maior ou menor retenção de quantidade de resíduos de OET, ETC e ETG, pois os teores encontrados não apresentaram variações de real importância (tabelas 2 e 4).

A manutenção dos materiais por cinco horas de aeração forçada, no interior da esterilizadora, e doze horas no ambiente, demonstrou que este tempo é suficiente para se obterem teores de resíduos de OET, ECT e ETG em níveis aceitáveis.

Agradecimentos

A Alaor Giacomini e Vera Regina Rossi Lemes, pela ajuda na execução das análises; às enfermeiras da Central de Material Esterilizado do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, que prepararam as amostras para estudo; às firmas Artefatos de Borracha Mucambo Ltda, Descartável Ind. Com. de Produtos Hospitalares Ltda. e à Artico Com. Ind. de Materiais Médico-hospitalares Ltda, pelo apoio técnico e colaboração prestados na realização deste trabalho.

RIALA6/654

NOGUEIRA, M.H.; AVELAR, M.C.Q.; BARRETO, H.H.C. & CARDOSO, D.P. A. - Toxic residues in cannulae and syringes sterilized and reesterilized with ethylene oxide. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1): 27-34, 1989.

ABSTRACT: Twenty three samples made up of plastic and rubber cannulae (tubes) and syringes of many sizes, reprocessed up to twenty times were analysed as to ethylene oxide residues and its reaction products ethylene chloridrin and glycol ethylene which might remain even after the aeration process. The results thereafter have been compared to the limits of tolerance established by the legislation in force and showed that the reesterilization does not bring about accumulative effects from the substances in the materials, with the exception of the 1 ml syringes.

DESCRIPTORS: sterilization, cannulae and syringes; ethylene oxide, residues, in reesterilized cannulae and syringes; cannulae (plastic, rubber); syringes (plastic).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS - *TLVs: the threshold limit values for chemical substances in the work environment. Adapted by ACGIH with intended changes for 1985 - 86*. Cincinnati, 1985. p. 2-43.
2. BABB, I.R.; PHELTF, M. & DOWNS, J. - Evaluation of an ethylene oxide sterilizer. *J. Hosp. Infect.*, 3(4): 385-94, 1982.
3. BRASIL. Leis, decretos etc. - Portaria nº 80 de 13 de fevereiro de 1986. *Diário Oficial*, Brasília, 14 fev. 1986. Seção I, p. 2471. Proíbe a utilização de ampolas de óxido de etileno... e apresenta no anexo I os limites máximos de resíduos em correlatos.
4. BRASIL. Ministério da Saúde - *Manual de controle de infecção hospitalar*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1985. 123p.
5. BRITO FILHO, D. - *Toxicologia humana*. Curitiba, Litel, 1983. p. 109.
6. ERNEST, R.R. & DOYLE, J.E. - Sterilization with gaseous ethylene oxide: a review of chemical and physical factors. *Biotechnol. Bioeng.*, 10: 1-31, 1968.
7. GLASER, Z.R. - Ethylene oxide: toxicology review and field study results of hospital use. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 2(5): 173-207, 1978.
8. GUESS, W.L.; JONES, A.B. - Solubility of ethylene oxide in selected plasticizers. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 26: 180-3, 1969.

9. GUNTHER, D.A. - Permeability of packaging materials to ethylene oxide. *Bull parent. Drug Assoc.*, 30(3):152-6, 1976.
10. LOVING, P.J.; ALLEN, R.O. & NOSHTR, T.J. - An evaluation of the accuracy and reability of ethylene oxide diffusion badge monitors. *Med. Instrum.*, 18(6)3-209-17, 1984.
11. MARSHALL, M.B.B.S. PEARSON, F.C.; SAGONA, M.A.; LEE, W.; WATHEN, R.L.; WARD, R.A. & DOLOVICH, J. - Reations during hemodialysis caused by allergy to ethylene oxide gas sterilization. *J. Allergy clin. Immunol.*, 75(5): 563-67, 1985.
12. MC GLOTHLEN, G.O. & WEIDA, D.A. - Recommendation for ETO gas sterilization of air-powered surgical instruments. *AORN J.*, 21(1):98-101, 1975.
13. NEVENHEIN, A. - Tests measure ethylene oxide risk to hospital's central supply staff. *Hospitals*, 53(6): 147-50, 1979.
14. NOGUEIRA, M.H. AVELAR, M.C.Q.; COSTA, M.G.P. & SANCHES, E.L. - Estudo do nível de impregnação do ar ambiental pelo óxido de etileno na central de material esterilizado. Parte 1. *Enfoque*, S.Paulo, 12(2): 32-5, 1984.
15. Ibid. Parte 2. *Enfoque*, S.Paulo, 13(1): 7-11, 1985.
16. RICHMOND, G.W. ABRAHAMS, R.H.; NEMENZO, J.H. & HINE, C.H. - An evaluation of possible effects on health following exposure to ethylene oxide. *Arch. Environ. Health*, 40(1) 20-5, 1985.
17. RUBBOS, D. & GARDNER, J.F. - Sterilization of syringes by ethylene oxide. *J.Appl.Bacteriol.*, 31(1): 164-9, 1968.
18. INTERNATIONAL TECHNICAL INFORMATION INSTITUTE - *Toxic and hazardous: industrial chemicals safety manual for handling and disposal with toxicity and hazard data*. Tokio, 1979. p.225-38.
19. YONG, R. & WALSH, P. - Sterilization of powered surgical instruments. *AORN J.*, 37(5): 945-75, 1983.

Recebido para publicação em 2 de Julho de 1988.

CARACTERIZAÇÃO DE BANANA (*MUSA* SP.) EM PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS, POR COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE CÉLULAS DE TANINO*

Marlene Correia dos SANTOS **
Claydes de Quadros ZAMBONI **

RIALA6/655

SANTOS, M.C. & ZAMBONI, C.Q. – Caracterização de banana (*Musa* sp.) em produtos industrializados, por coloração diferencial de células de tanino. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):35-39, 1989.

RESUMO: A banana é uma fruta industrialmente importante, por ser matéria prima de vários produtos em flocos ou em forma de doces e purês. Na análise microscópica de alimentos, a identificação da banana, nesses produtos, é dificultada pela pequena quantidade de elementos histológicos do seu mesocarpo. Os autores desenvolveram um método para identificação das células de tanino (células contendo depósitos fenólicos), presentes no mesocarpo da fruta, já em nível de microscópio estereoscópico, utilizando a propriedade de coloração destas células com solução de cloreto férrico a 3%. Por este método, as células contendo depósitos fenólicos coram-se de azul-escuro, distinguindo-se dos outros elementos histológicos que não se coram. O método de coloração utilizado, mostrou-se mais eficiente em produtos onde a fruta é utilizada em estágio intermediário de maturação.

DESCRITORES: banana (*Musa* sp.), tanino da, em produtos industrializados; tanino da banana em produtos industrializados, detecção; método microscópico.

INTRODUÇÃO

A banana é uma fruta de região tropical e subtropical, cultivada em grande escala em nosso país, com importância agrícola e na alimentação humana⁶.

É uma fruta comercialmente importante, pois do seu processamento industrial resultam vários produtos como purê, bananada, flocos em misturas enriquecidas, banana liofilizada etc. Pode ser colhida em fase intermediária de maturação, o que lhe proporciona maior resistência aos impactos da colheita e do transporte⁴.

Como a maioria das frutas, a banana tem como parte principal aproveitável o mesocarpo que forma a polpa da fruta. Este, na banana, contém células amilíferas arredondadas ou alongadas e

feixes de vasos espiralados ou espiro-reticulados, acompanhados de células de tanino^{6,8}.

O tanino afeta a cor e o sabor de algumas frutas, como a banana, e é responsável por um certo grau de adstringência em frutas verdes. A quantidade de tanino presente varia com o estágio de crescimento, condições fisiológicas e outros fatores. Com o amadurecimento da fruta, estes compostos são reduzidos em quantidade, havendo perda de adstringência, o que torna a fruta mais saborosa.^{1,2,3,4,5}

Tanino é uma classe de polifenóis de variável complexidade e tamanho molecular e solúveis em água. São produtos de secreção celular não mais utilizados pela planta, depositados no vacúolo de células secretoras, as células taníferas, que se apresentam muito ampliadas especialmente em

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

comprimento e formam, com freqüência, sistemas conectados que podem estar ou não associados aos feixes espiralados ou espiro-reticulados^{1,3,4}

A análise microscópica de alimentos, visando a identificação de matérias alimentares, tem um papel importante em Bromatologia, tanto para reconhecimento dos elementos vegetais que compõem o produto, como para constatação de fraudes nos mesmos. Essa identificação, muitas vezes, é dificultada por vários fatores como alterações celulares que podem ocorrer no vegetal durante o processamento industrial, por haver uma mistura de vegetais num só produto ou por se tratar de um vegetal com poucas estruturas histológicas características.

Nos produtos contendo banana, sua presença é constatada através da identificação de células de tanino (células com depósitos fenólicos). Quando a banana está misturada com outros alimentos, a identificação destas células traz dificuldades ao analista pela pequena quantidade dos elementos característicos presentes.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir para uma identificação mais rápida e apurada das células de tanino, em produtos de banana industrializada.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 30 amostras de produtos de banana, sendo 8 amostras de mistura para preparo de mingau de aveia com banana liofilizada, enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise, 8 amostras de bananada, 7 amostras de alimento infantil com aveia, e 7 amostras de alimento infantil de banana, maçã e abacaxi, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo.

Foram preparadas duas amostras-padrão de purê de banana: amostra "A", com fruta em estágio intermediário de amadurecimento, e amostra "B", com fruta bem madura.

Material

Tamis nº 45
Erlenmeyer de 500 ml
Béquer de 400 ml
Chapa elétrica
Papel de filtro
Equipamento para filtração a vácuo
Microscópio estereoscópico
Microscópio óptico

Reagentes

Solução de FeCl₃ a 3%
Solução de NaOH a 5%

Métodos

a) *Método de coloração desenvolvido baseado nos princípios descritos por JOHANSEN E STEVENS*^{5,7}.

Pesar 30 gramas de amostra, dissolver em 200 ml de água e passar em tamis nº 45, lavando com água para retirar o amido. Transferir o material retido no tamis para um béquer, adicionar 30 ml de solução aquosa de cloreto férrico a 3% e filtrar a vácuo sobre papel de filtro. Examinar o material ao microscópio estereoscópico (10 X) e ao microscópio óptico (100 X).

b) *Método desenvolvido na Seção de Microscopia Alimentar baseado nos princípios descritos por Wallis*⁸.

Pesar 30 gramas de amostra em Erlenmeyer de 500 ml, juntar 200 ml de solução de hidróxido de sódio a 5%, aquecer até a ebulição em chapa elétrica, agitando ocasionalmente. Deixar esfriar e filtrar a vácuo sobre papel de filtro. Examinar o material ao microscópio estereoscópico (10 X) e ao microscópio óptico (100 X).

RESULTADOS

Os taninos encontrados no interior das células taníferas, sendo compostos fenólicos, reagem com soluções aquosas de cloreto férrico, dando precipitados de coloração azul-escuro^{5,7}.

No material das amostras-padrão de purê de banana (amostras A) e na mistura para preparo de mingau de aveia com banana liofilizada, coradas com solução aquosa de cloreto férrico, quando foram examinadas ao microscópio estereoscópico, observou-se grande quantidade de elementos corados de azul-escuro, agrupados em forma de cadeia, ou isolados, indicando células com depósitos fenólicos que se coraram, permitindo uma fácil identificação dessas células. Transferindo esses elementos corados para lâmina e lâminula e examinando ao microscópio óptico (100 X), verificou-se a presença de células de tanino coradas em azul-escuro, isoladas ou agrupadas, formando cadeias, e associadas aos vasos espiralados e espiro-reticulados. Nessas amostras observaram-se poucas células com depósitos fenólicos oxidados, de colocação marrom-avermelhada (fig. 1).

No material das amostras-padrão de purê de banana (amostras B) e em bananada e alimentos infantis, corados com solução aquosa de cloreto férrico, quando foram examinadas ao microscópio estereoscópico (10 X), verificou-se um pequeno número de células coradas de azul-escuro e um número de células de coloração marrom-avermelhada, ambas agrupadas em forma de cadeia, ou isoladas. Transferindo-se os elementos corados para lâmina e lâminula e examinando-se ao microscópio óptico (100 X), constatou-se a presença de células com depósitos fenólicos, algumas que se coraram pelo cloreto férrico,

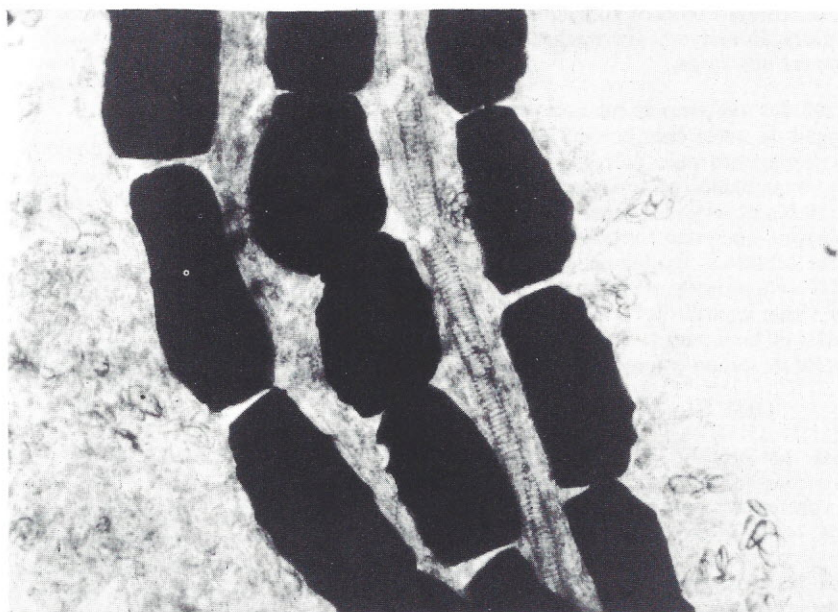


FIGURA 1 – Células com depósitos fenólicos, agrupadas em cadeia, coradas por cloreto férrico. 100 x. Ampliada.

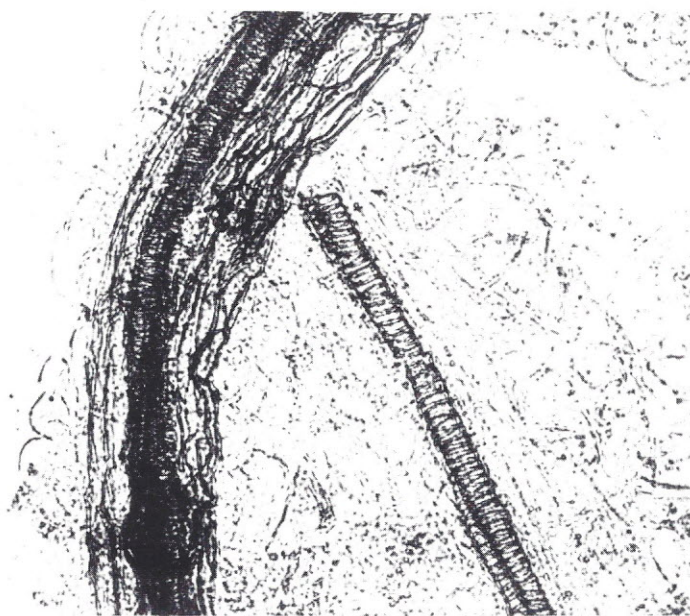


FIGURA 2 – Células com depósitos fenólicos alteradas por hidrólise alcalina (NaOH). 100 x. Ampliada.

aparecendo na cor azul, isoladas ou associadas aos vasos espiralados e espiro-reticulados, e a maior parte que não se coram aparecendo como células com depósitos fenólicos oxidados (flobafenos), de coloração marrom-avermelhada, isoladas ou associadas aos vasos.

No material das amostras de mistura para preparo de mingau de aveia com banana liofilizada, obtido após tratamento pelo hidróxido de sódio (método b), examinado ao microscópio estereoscópico (10 X), observou-se uma massa amorfa de cor marrom, onde não foi possível identificar elementos celulares. Examinando uma parte desse material ao microscópio óptico (100 X), observaram-se vasos espiralados e espiro-reticulados sem células de tanino à sua volta ou, raras vezes, com células de tanino fragmentadas (fig. 2).

DISCUSSÃO

Ao analisar um produto de banana liofilizada misturada a cereais triturados, pelo fato de todo o material se apresentar como pequenos flocos esbranquiçados, torna-se difícil identificar as células de tanino do restante do material. Com o auxílio de técnica de coloração com cloreto férrico, é possível observar estas células já em nível de microscópio estereoscópico, facilitando bastante a identificação histológica. Nestes produtos, a banana utilizada para liofilização não é totalmente amadurecida, e a quantidade de compostos fenólicos não oxidados (tanino) no interior das células é grande, permitindo encontrar muitas células coradas de azul-escuro.

Em bananada, purê e alimentos infantis de frutas com banana, é utilizada na fabricação a fruta bem madura, na qual a quantidade de compostos fenólicos ou está bem reduzida ou em muitas células estes compostos estão oxidados, resultando em flobafenos, que dão uma cor marrom ou marrom-avermelhada às células taniníferas, encontrando-se um menor número de células coradas de azul-escuro^{1,3,4}.

Em produtos de mistura de banana liofilizada com cereais, o método de tratamento da amostra com hidróxido de sódio a quente e filtração a vácuo, para evidenciar as estruturas histológicas características presentes e destruição do amido do cereal, foi menos eficiente que o método de tamisação e coloração com cloreto férrico.

Examinando o material tratado pelo hidróxido de sódio retido no papel de filtro ao microscópio óptico (100 X), observaram-se vasos espiralados e espiro-reticulados sem células de tanino à sua volta ou, raras vezes, com células de tanino fragmentadas, indicando que o hidróxido de sódio ao mesmo tempo em que concentrou os elementos histológicos da amostra pela destruição do amido do cereal, também dificultou a identificação da banana por ter descaracterizado as células taniníferas.

CONCLUSÃO

Em produtos alimentícios, onde a banana é utilizada parcialmente amadurecida, a presença de células com depósitos fenólicos (tanino), que foram coradas com solução de cloreto férrico a 3%, são facilmente identificadas, por apresentarem tonalidade azul-escuro.

Por outro lado, um alimento no qual é utilizada a fruta bem madura, onde o tanino presente é reduzido ou está oxidado, verifica-se, além das células com coloração azul-escuro, outras com coloração marrom-avermelhada, que não foram coradas pelo cloreto férrico e estão presentes em maior quantidade.

O método para coloração de compostos fenólicos, presentes nas células taniníferas do mesocarpo da banana, com cloreto férrico permite ao analista de microscopia alimentar a identificação histológica, tanto da banana parcialmente amadurecida como da fruta bem madura.

RIALA6/655

SANTOS, M.C. & ZAMBONI, C.Q. - Differential staining of tannin cells of banana (*Musa sp.*) in commercial products. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 35-39, 1989.

ABSTRACT: A method was developed to detect the fruit *Musa sp.* in commercial products, such as powders and fruit paste. A staining procedure was described for the stereoscopic and light microscopic identification of tannin cells present in the mesocarp of *Musa sp.* The samples were dissolved in water, passed through a sieve and stained with 3% ferric chloride solution. Tannin deposits of banana cells stained dark-blue and were distinguished from others histological elements, which were unstained. This staining procedure should prove more efficient in products with the fruit in intermediary stage of maturation.

DESCRIPTORS: banana (*Musa sp.*), tannin of, in manufactured products; tannin in banana manufactured products, detection; microscopical method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ESAU, K. - *Anatomia das plantas com sementes*. Trad. por Berta Lange de Morretes. São Paulo, Edgard Blucher, 1974. p. 125-31.
2. GRISWOLD, R.M. - *Estudo experimental dos alimentos*. Trad. por Avany Corrêa Santos. São Paulo, Edgard Blucher, 1972. p. 144-5
3. HASLAM, E. - Vegetable tannins. In: CONN, E.E., ed.- *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. v.7: *secondary plant products*. New York, Academic Press, 1981, p. 527-55.
4. INDUSTRIALIZAÇÃO de frutas. *Mundo Agric.*, 1(1): 109, 1975.
5. JOHANSEN, D.A. - *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill, 1940. p. 143.
6. MENEZES, J.B.F. - Investigações sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9:18-77, 1949.
7. STEVENS, W.C. - *Plant anatomy*. 3rd ed. Philadelphia, Blakiston's Son, 1916. p. 309.
8. WALLIS, T.E. - *Microscopia analítica: sus fines, y metodos en relación a los alimentos, agua, especias y medicamentos*. Trad. por Jaime Gallego Berenguer. Zaragoza, Acribia, 1968 p. 166.

Recebido para publicação em 16 de agosto de 1988.

INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM E PRODUTOS DERIVADOS CONSUMIDOS NA CIDADE DE SÃO PAULO, NO PERÍODO DE 1980 A 1987*

Myrna SABINO **
M. Ângela P. ZORZETTO **
Marcelo O. PEDROSO **
Thais V. MILANEZ **

RIALA6/656

SABINO, M.; ZORZETTO, M.Â.P.; PEDROSO, M. O. & MILANEZ, T.V. – Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):41-44, 1989.

RESUMO: Aflatoxinas foram identificadas por cromatografia em camada delgada em 1.374 amostras de amendoim e derivados, expostas ao consumo na cidade de São Paulo. Os níveis de contaminação variaram de ano para ano, onde se observou que em 576 das amostras analisadas foram detectadas aflatoxinas. Destas, 68,75% apresentaram níveis superiores a 30 µg/kg, que é o máximo tolerado pela legislação brasileira.

DESCRITORES: aflatoxinas em amendoim e produtos de, determinação; amendoim, aflatoxinas em, determinação; cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são compostos produzidos por fungos que são tóxicos para os animais e para o homem, quando consumidos nos alimentos.

Dentre as micotoxinas conhecidas, as mais estudadas são, sem dúvida, as aflatoxinas. A presença de aflatoxinas em produtos alimentícios depende de sua formação por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e todas as cepas de *A. parasiticus*, assim como também por outros fungos relacionados com a deterioração de alimentos e rações^{1,2}.

Alguns produtos alimentícios são substratos mais susceptíveis do que outros ao crescimento de fungos, como por exemplo o amendoim.

A toxicidade do amendoim resulta do crescimento das cepas do *A. flavus* e do *A. parasiticus* fundamentalmente^{1,2}. Estes fungos são capazes de

crescer a níveis relativamente baixos de atividade de água (Aa). O amendoim, na hora da colheita, pode apresentar teores de umidade acima de 30%, a menos que as sementes sejam secadas a um nível menor do que 9% (Aa=0,75). Imediatamente após a retirada do solo, haverá o crescimento do *A. flavus* nas sementes⁴. O produto do metabolismo deste fungos leva à formação de aflatoxinas, que apresentam uma grande importância sob o ponto de vista toxicológico, pois a aflatoxina B₁ é considerada um dos mais poderosos hepatotóxicos e potente carcinógeno químico³. A contaminação por aflatoxinas é um grande problema na produção de amendoim no Brasil, pois nosso clima é tropical, reunindo assim condições favoráveis para a proliferação dos fungos. A produção de amendoim no Brasil a partir dos anos 70 declinou consideravelmente devido ao incentivo governamental ao cultivo da soja, e a sua produção hoje é similar ou menor do que em 1958¹. A sua produção passou a ser praticamente realizada por pequenos produtores, com sistema rudimentar

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

de colheita, tornando o produto vulnerável a fungos produtores de aflatoxinas. O amendoim é uma importante fonte de proteína e o seu consumo é ainda em grande escala, como podemos observar nas diversas formas de sua comercialização e também por se tratar de uma cultura típica de países em desenvolvimento. O Instituto Adolfo Lutz mantém periodicamente um controle da incidência de aflatoxinas em produtos alimentícios^{7,8,9}.

O controle ou prevenção das aflatoxinas em alimentos, como em qualquer outro país, é um problema de controle de qualidade. Procuramos neste trabalho mostrar a incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e derivados, expostos ao consumo na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987, pois somente um conjunto de dados obtidos em análises freqüentes e periódicas permite avaliar os níveis de contaminantes nos alimentos, quais as tendências, se estão se elevando ou não.

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 1.374 amostras de amendoim e produtos derivados no período de janeiro/dezembro de 1980 a 1987, para determinar

aflatoxinas. Algumas delas foram adquiridas nos mercados da cidade de São Paulo, e outras foram remetidas ao Instituto Adolfo Lutz para análise. A metodologia utilizada está descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁰. O extrato clorofórmico final obtido foi utilizado para a identificação e quantificação das aflatoxinas, por cromatografia em camada delgada. O método de quantificação em cromatoplasca utilizado foi por comparação visual das intensidades de fluorescências entre os padrões das aflatoxinas e o extrato da amostra, sendo essa comparação feita sempre na mesma cromatoplasca¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela abaixo, onde se verifica a evidência de aflatoxinas em várias amostras. A figura da página seguinte apresenta a relação da percentagem entre o número de amostras onde não foram detectadas aflatoxinas, o número de amostras contendo teores acima de 30 µg/kg e o número de amostras com teores abaixo de 30 µg/kg. Os teores de aflatoxinas foram expressos em µg/kg (ppb) e o não aparecimento de fluorescência no cromatograma foi representado pela abreviatura N.D. (não detectada).

TABELA

Níveis de aflatoxinas em amendoim e derivados consumidos em São Paulo, no período de 1980 a 1987

Ano	Nº de amostras	Amostras analisadas			Média das amostras positivas µg/kg	90º percentil µg/kg	Nível de variação	
		N.D.* Limite de determinação 8 µg/kg	Nº amostras > 30 µg/kg**	Nº amostras < 30 µg/kg**			Mínimo µg/kg	Máximo µg/kg
1980	82	33	26	23	239,0	278	8	3.000
1981	44	33	08	03	31,5	42	10	520
1982	132	38	53	41	74,0	120	8	2.500
1983	198	100	83	15	333,0	864	8	864
1984	279	190	57	32	81,0	136	8	4.000
1985	275	199	47	29	91,0	124	8	6.561
1986	241	119	97	25	46,5	140	8	1.007
1987	123	86	25	12	94,3	88	8	437
Total	1.374	798	396	180				

* N.D. = não detectado.

** 30 µg/kg = limite máximo tolerado na Legislação Brasileira (B₁ + G₁).

Observação: resultados baseados no total da amostra.

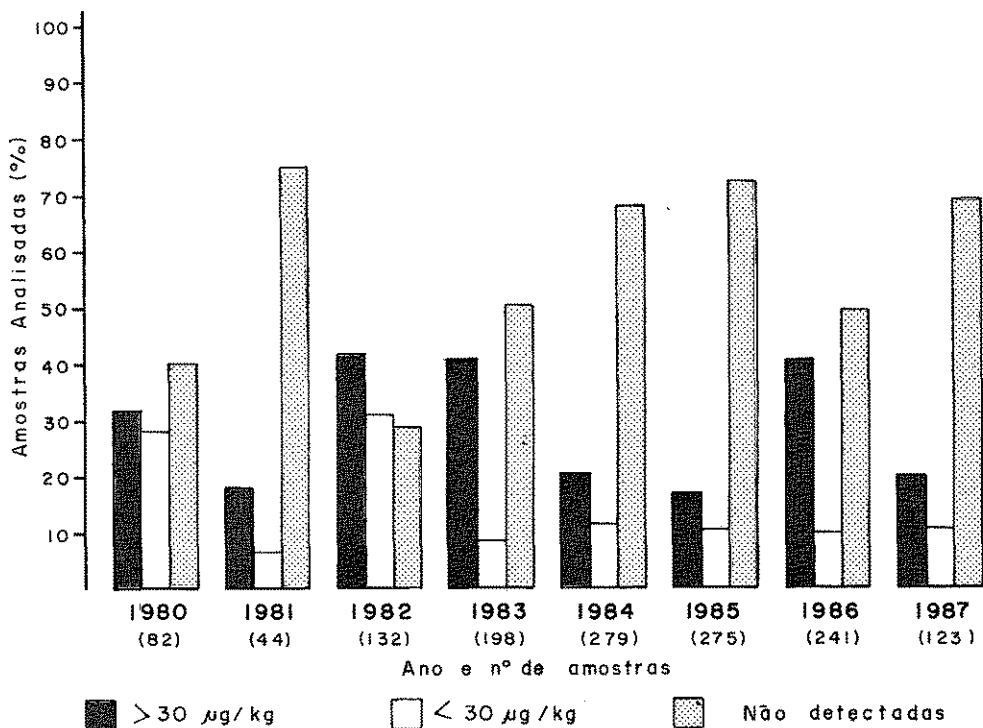


FIGURA – Relação entre a percentagem de amostras contaminadas por aflatoxinas e não detectadas no período de 1980 a 1987.

Aflatoxinas foram detectadas em 576 das 1.374 amostras analisadas, expostas ao consumo. Observa-se que os níveis de contaminação variaram de ano para ano. Das amostras detectadas 68,75% apresentaram níveis superiores a 30µg/kg, que é o máximo tolerado pela legislação brasileira. Na literatura existem alguns dados sobre a ocorrência de aflatoxinas em produtos brasileiros^{6,11}, sendo que em aproximadamente 40% das amostras analisadas os teores de aflatoxinas detectados estavam acima do limite tolerado pela legislação brasileira². A operação de secagem pós-colheita é de extrema importância na limitação dos níveis de aflatoxinas nas sementes. O retardamento desta operação aumenta os riscos do crescimento de fungos e a formação de micotoxinas. O amendoim é particularmente vulnerável, uma vez que ele transporta na casca grandes quantidades de inóculo de *A. flavus* a partir do contato íntimo com o solo. A deterioração da vagem permite a penetração do fungo, aumentando posteriormente o risco da contaminação da semente por aflatoxina⁵.

Podemos verificar que o problema de contaminação por aflatoxinas em alimentos é uma preocupação para a saúde pública. O Instituto

Adolfo Lutz mantém um controle periódico de incidência de aflatoxinas em alimentos e este trabalho é um complemento de levantamentos efetuados anteriormente^{8,9}.

CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados pode-se observar que aflaxinas estiveram presentes em várias amostras e não é possível assegurar o grau satisfatório de qualidade dos alimentos sem uma vigilância constante da contaminação.

O controle dos níveis de aflatoxinas nos alimentos torna-se uma necessidade, não só para a proteção da saúde pública, como para orientar as ações governamentais. Considerando a extensão do país e as diferenças regionais, um programa nacional de análise de vigilância é um projeto que deve ser muito bem planejado para ser executado. Só o levantamento contínuo desses dados poderá prevenir problemas que, por não serem imediatos, podem ser irreparáveis. Mas só o controle no sentido de analisar e levantar dados não servirá de nada se não for o ponto de partida para atitudes governamentais e outras ações.

RIALA6/656

SABINO, M.; ZORZETTO, M.A.P.; PEDROSO, M. O. & MILANEZ, T.V. – Incidence of aflatoxins in peanut and peanut products consumed in São Paulo City, for the period 1980-1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):41-44, 1989.

ABSTRACT: Thin-layer chromatography was employed for determination of the amount of aflatoxins in 1,374 samples of peanut and peanut products sold for consumption in São Paulo City. Aflatoxins were detected in 576 samples where the levels of contamination varied from year to year. Among these samples, 68,75% showed levels greater than 30 µg/kg that is the maximum tolerated by pertinent Brazilian legislation.

DESCRIPTORS: aflatoxins in peanut and peanut products, determination; peanut, aflatoxins in, determination; thin-layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMENDOIM: perspectivas internacionais. *Cacex: informação semanal*, 20 (960):3, 1985.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. – Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, pt. I, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
3. IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Man. Lyon, 1975. *Some naturally occurring substances*. Lyon, IARC, 1976. p. 51-72 (IARC Monographs, 10).
4. JARVIS, B. – Factors affecting the production of mycotoxins. *J. appl. Bacteriol.*, 34(1):192-213, 1971.
5. JOINT FAO/WHO/UNEP CONFERENCE ON MYCOTOXINS, Nairobi, 1977. *Perspective on Mycotoxins*. Rome, FAO, 1979, p.19 (FAO Food and Nutrition Paper, 13).
6. PRADO, G. – Incidência de aflatoxina B₁ em alimentos. *Rev. Farm. Bioquím.*, Belo Horizonte, 5(2): 147-57, 1983.
7. PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. – Pesquisa e dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 65-71, 1969/70.
8. SABINO, M. – Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40 (2):153-8, 1980.
9. SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. – Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidos no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):39-44, 1982.
10. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz – *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 2ª ed. São Paulo, 1976. p. 323-5.
11. SCUSSEL, V.M. & RODRIGUES-AMAYA, D. – Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980/82. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 19 (2): 109-19, 1985.
12. STOLOFF, L. & SCOTT, P.M. – Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th ed. Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1984. p.481-3.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION – *Mycotoxins*. Geneva, WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria, 11).

Recebido para publicação em 16 de agosto de 1988.

VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE E IDENTIDADE DE CHÁS MEDICINAIS *

Mônica Arcon BATISTIC **
Mariangela Tirico AURICCHIO **
Vânia Rodrigues HOPPEN **
Isaura Yuriko YAMASHITA **

RIALA6/657

BATISTIC, M.A.; AURICCHIO, M.T.; HOPPEN, V.R. & YAMASHITA, I.Y. – Verificação da qualidade e identidade de chás medicinais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1):45-49, 1989.

RESUMO: Foram analisadas 96 amostras de chás medicinais de 11 espécies diferentes com o objetivo de avaliar a qualidade e identidade destes produtos disponíveis no mercado. Foram constatadas substituições das espécies indicadas na maioria das amostras de erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), catuaba (*Anemopaegma mirandum*) e espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). A importância da determinação de cinzas insolúveis em ácido como parâmetro de qualidade em relação à presença de matéria mineral estranha é discutida.

DESCRITORES: chá (plantas medicinais), identificação das espécies; chá, matéria mineral estranha em, determinação; método das cinzas insolúveis em ácido.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 30, os autores brasileiros discutem o problema da qualidade dos fitoterápicos e plantas medicinais, relacionando, desde então, o conjunto de fatores que influencia a qualidade de um produto dessa natureza^{1,2,4,10,11,12}. Ainda hoje esta situação persiste, pois a qualidade das drogas oferecidas no comércio ao consumidor é preocupante. O uso de plantas medicinais, principalmente quando ingeridas na forma de chá, sempre esteve presente no dia a dia da população de baixa renda, suprimindo dessa forma as suas necessidades de assistência médica primária³. Entretanto, a partir de 1980 seu uso retomou prestígio também entre as outras camadas sociais, como cita SCHENKEL¹¹ impulsionadas em parte pelo modismo de produtos naturais na alimentação e em produtos cosméticos. Contudo, poucos trabalhos foram publicados enfocando aspectos do controle de qualidade de fitoterápicos. Desta forma, o mercado tornou-se muito atraente e os

empresários do setor, utilizando-se da falta de informação do público em geral, apresentam o produto como se fosse curativo de todos os males, exacerbando as propriedades terapêuticas do mesmo. Todas essas considerações, na verdade, só diminuem a credibilidade na fitoterapia junto à medicina e, numa fase posterior, a do próprio consumidor.

O presente trabalho visou avaliar a qualidade dos chás medicinais disponíveis no mercado, que foram recebidos pela Seção de Farmacognosia do IAL para análise de fiscalização. Foram enfocados os parâmetros de identidade e presença de materiais estranhos, incluindo a determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido, em 96 amostras de diferentes espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 96 amostras de chás de plantas medicinais, colhidas pelo Centro de Vigilância Sanitária e pela Delegacia do Consumidor

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

(DECON) no comércio da capital, recebidas pela Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz para análise de fiscalização. Foram examinadas 11 espécies diferentes de chás abaixo relacionadas:

- Carqueja - 19 amostras
- Erva-doce - 18 amostras
- Erva-cidreira - 14 amostras
- Camomila - 7 amostras
- Catuaba - 7 amostras
- Espinheira-santa - 7 amostras
- Comfrey - 7 amostras
- Boldo - 8 amostras
- Hortelã - 4 amostras
- Sene - 3 amostras
- Stévia - 2 amostras

As amostras recebidas eram inicialmente analisadas sob o ponto de vista macroscópico, pela simples observação do material à vista desarmada e com o auxílio de um microscópio estereoscópio. Este procedimento visava a verificação da identidade da parte usada da droga, homogeneidade, presença de matérias estranhas à droga (outras além da parte usada da mesma), presença de sujidades como areia, terra, pedras, e presença de parasitos, vivos ou mortos, assim como produtos de seus metabolismos. Na análise dos chás de carqueja (*Baccharis* sp.), foi realizada a técnica da catação para a separação entre os fragmentos desprovidos de folhas e os outros fragmentos de folhas ou de caules menores com folhas. Obser-

vou-se que a quantidade daqueles excedia a quantidade da parte da droga recomendada, que é a planta florida; através de pesagem, calculou-se a porcentagem de uma parte e de outra. Em seguida, as amostras foram preparadas para a análise microscópica através de técnicas histológicas já preconizadas⁹, com descoloração dos cortes histológicos por solução de hipoclorito de sódio, a 5%. As determinações de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido foram realizadas, segundo a técnica geral descrita na Farmacopéia Brasileira, 3ª edição⁸, a partir de uma tomada de ensaio equivalente a 3 gramas de amostra homogeneizada.

RESULTADOS

Os resultados e observações das análises realizadas nos chás de onze espécies diferentes de drogas estão descritos a seguir, assim como os valores encontrados nas determinações de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido enumeradas na tabela abaixo.

Carqueja

A análise macroscópica, através de um microscópio estereoscópio e, posteriormente, à vista desarmada, revelou a presença de grande quantidade de caules, de tamanhos e espessuras variados, desprovidos de folhas; raramente foram encontradas partes correspondentes às sumidades floridas.

A análise microscópica confirmou serem os chás pertencentes ao gênero *Baccharis*.

Valores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido encontrados nos chás medicinais analisados

Amostras	Número de Amostras	Cinzas Totais g/100 g		Cinzas insolúveis em ácido g/100 g	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Carqueja	19	1,75	5,86	0,12	1,53
Erva-doce	18	6,56	24,79	0,79	19,51
Erva-cidreira	14	5,29	14,82	0,71	8,65
Camomila	7	7,16	9,49	2,80	4,18
Catuaba	7	4,63	6,75	1,28	2,38
Espinheira-santa	7	5,77	13,21	2,07	6,78
Comfrey	7	14,76	29,28	4,50	7,88
Boldo	8	9,53	12,87	2,58	9,99
Hortelã	4	9,21	10,00	3,23	3,91
Sene	3	9,52	9,61	2,27	5,78
Stévia	2	8,37	11,49	2,60	6,37

Erva-doce

A simples observação macroscópica através de um microscópio estereoscópio das amostras de erva-doce é suficiente para a caracterização da droga quanto à sua identidade pois as características do fruto da erva-doce (*Pimpinella anisum*) são bem diferentes das do funcho (*Foeniculum vulgare*) e de outros frutos da família *Umbelliferae*.

Das 18 amostras analisadas, 14 não eram constituídas pela erva-doce e sim pelo funcho; 3 amostras apresentaram mistura das duas espécies, e apenas uma amostra era constituída pela erva-doce.

No exame macroscópico, verificou-se ainda a presença de pedras e areia o que, conseqüentemente, leva a um aumento dos resultados das cinzas totais e insolúveis em ácido.

Erva-cidreira

Todas as amostras analisadas de erva-cidreira, que corretamente é o nome popular da *Melissa officinalis*, eram constituídas pela espécie *Cymbopogon citratus*, vulgarmente conhecida como capim-limão e chá-de-estrada. As amostras não apresentaram sujidades e/ou parasitos.

Camomila

Na análise macroscópica dos chás de camomila, observou-se que em uma das amostras, que não estava tão fragmentada, a quantidade de pedúnculos excedia a dos outros elementos do capítulo floral. Todas as amostras analisadas eram constituídas pelo gênero *Matricaria chamomila* L. e em duas amostras observou-se a presença de insetos vivos e mortos (carunchos).

Catuaba

As amostras analisadas, sob o ponto de vista macroscópico, eram constituídas por fragmentos de caule, de coloração avermelhada, diferentes macro e microscopicamente do padrão de *Anemopaegma mirandum*.

Espinheira-Santa

Das amostras analisadas, quatro não foram identificadas como sendo do gênero *Maytenus* sp., fato confirmado por outras três amostras.

Comfrey

As amostras analisadas revelaram tratar-se de *Symphytum officinale* L. Três amostras, no exame macroscópico apresentaram insetos vivos.

Boldo, Hortelã, Sene e Stévia

Todas as amostras destes chás corresponderam respectivamente às seguintes espécies: *Peumus boldus* (molina) Lyons, *Mentha* sp., *Cassia angustifolia* Vahl e *Stevia rebaudiana* Bertoni. Em nenhuma das amostras foram encontradas sujidades e/ou parasitos.

DISCUSSÃO

Na análise dos chás, foram abordados os aspectos de identidade e qualidade da droga. Quando à identidade, procurou-se caracterizar a espécie empregada na elaboração do produto. Dentre as amostras estudadas, as de carqueja, boldo, comfrey, hortelã e stévia foram as que não apresentaram problemas de alterações ou falsificações, tendo sempre identificação positiva quanto à espécie empregada. O mesmo não foi constatado com as amostras de erva-doce pois, na maioria das amostras analisadas, a espécie *Pimpinella anisum* (erva-doce) foi substituída pelo *Foeniculum vulgare* (funcho). A comercialização da erva-doce tem-se dado de forma um tanto polêmica, pois há interesse em que o nome popular erva-doce nacional seja adotado legalmente para a espécie *Foeniculum vulgare*.

Praticamente, o mesmo ocorre para a erva-cidreira, nome popular para a espécie *Melissa officinalis*, segundo a Farmacopéia Brasileira. Contudo, tem sido comercializada como erva cidreira a espécie *Cymbopogon citratus*, vulgarmente conhecida como capim-limão, capim-cidrão, chá-de-estrada e outros. Analogamente, a espécie comercializada amplamente como catuaba não corresponde à espécie *Anemopaegma mirandum* inscrita na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1ª edição⁶. Para a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), embora não inscrita na Farmacopéia, foram verificadas para algumas amostras a não correspondência da espécie analisada com o padrão.

Tão importante quanto a identidade é o aspecto da qualidade que se traduz pelas condições higiênicas do produto e presença de materiais orgânicos estranhos, como uso de outras partes do vegetal empregado que não são a droga, já que partes como estas contêm menos ou nenhum princípio ativo, mas conferem peso ao material. Neste último caso, podemos citar as amostras de carqueja, onde predominam caules de tamanho e espessuras variáveis e rareiam as sumidades floridas,

e as amostras de camomila, onde muitas vezes a quantidade de pedúnculos estava presente em maior quantidade, ultrapassando o índice de 5% recomendado nas farmacopéias brasileiras 1^a e 2^a edições^{6,7}. As farmacopéias brasileiras, 1^a, 2^a e 3^a edições, recomendam para algumas drogas a observação desse fator e dão índices em porcentagem da quantidade máxima de material estranho que pode estar presente na droga analisada.

Quanto ao aspecto higiênico, foi observada presença de parasitos, assim como de produtos de seus metabolismos e presença de sujidades, ou seja, materiais inorgânicos como partículas de areia e terra em especial, que podem estar presentes aderidos à superfície da droga, ou livres, juntamente com a droga, quando são de tamanho maior. Este último fator é de suma importância na análise de uma droga; uma forma de se verificar numericamente a porcentagem dessas sujidades seria pela realização de determinações de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, particularmente, que quantificaria a sílica proveniente da areia e terra, as chamadas "cinzas não fisiológicas". As várias farmacopéias internacionais, da Inglaterra, França, Estados Unidos, Itália, Japão, diferem na metodologia para a determinação das cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido⁸, principalmente quanto à tomada de ensaio e temperatura de incineração das amostras. Optou-se, em nosso estudo, pelas determinações descritas na Farmacopéia Brasileira, 3^a edição⁵. É importante salientar que nas três edições das farmacopéias brasileiras^{5,6,7} houve um decréscimo no número das monografias de drogas que mencionam índices permitidos para cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, e observações para matérias estranhas. Das amostras analisadas nesse estudo, só o sene pode ser avaliado, quanto aos índices de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, por comparação com os valores apresentados na farma-

copéias. Já nas monografias de camomila, erva-doce, boldo e hortelã aparecem apenas índices para a determinação de cinzas totais. Verificou-se que, apesar de os índices de cinzas totais nas amostras de sene estarem de acordo com os exigidos pelas farmacopéias^{5,6,7}, os índices de cinzas insolúveis em ácido excederam esses valores. Sendo a determinação de cinzas insolúveis em ácido o modo mais preciso de se quantificarem matérias estranhas silíceas, acreditamos que a existencia nas monografias dos limites máximos para esta determinação seja mais importante que a dos limites estabelecidos para cinzas totais.

CONCLUSÃO

As análises realizadas num laboratório de controle de qualidade oficial são orientadas pelas normas e especificações dos Códigos e Farmacopéias. Dessa forma, as denominações científicas e populares devem estar de acordo com estas especificações. Os nomes científicos *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus* devem corresponder aos nomes populares erva-doce, funcho, erva-cidreira, capim-limão, respectivamente, até que alterações para novas denominações populares sejam oficializadas. As mesmas considerações valem para a catuaba, amplamente difundida, que não corresponde à espécie descrita na Farmacopéia Brasileira^{5,6,7}.

Embora as três edições da farmacopéia Brasileira tenham trazido índices de cinzas totais para a maioria das monografias e, em raros casos, apresentado índice de cinzas insolúveis em ácido, assim como presença de matérias orgânicas estranhas, sugere-se a revisão destes valores e introdução obrigatória destas determinações em todas as monografias de drogas vegetais inscritas na Farmacopéia Brasileira.

RIALA6/657

BATISTIC, M.A.; AURICCHIO, M.T.; HOPPEN, V.R. & YAMASHITA, I.Y. - Quality and identity of medicinal teas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1):45-49, 1989.

ABSTRACT: Ninety and six samples of different kinds of medicinal teas were analyzed so that the quality and identity of the products available in the market could be evaluated. In most of the samples of anise (*Pimpinella anisum*), balm mint (*Melissa officinalis*), "catuaba" (*Are-mopae-gma mirandum*) and "espinheira-santa" (*Maytenus ilicifolia*) substitutions of the indicated species were evidenced. The study still discusses the determination of acid-insoluble ashes as quality parameter concerning the presence of strange mineral material.

DESCRIPTORS: tea (medicinal plants), species identification; tea, strange mineral material in, determination; acid-insoluble ashes method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COSTA, O.A. – Índice analítico da história das plantas medicinais e úteis do Brasil. *Rev. Flora med.*, 2(9):531, 1936.
2. CRUZ, J.P.G – O commercio e cultura de plantas medicinaes. *Rev. Flora med.*, 2 (12):765-85, 1936.
3. ELISABETSKY, E. – Pesquisas em plantas medicinais. *Ciênc. cult.*, 39 (8):697-702, 1987.
4. FARIAS, M.R., SCHENKEL, E.P., BERGOLD, A.M. & PETROVICK, P. R. – O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Cad. Farm.*, 1(2):73-82, 1985.
5. FARMACOPÉIA brasileira. 3ª ed. São Paulo, Andrei, 1977. p. 829-31.
6. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo, Editora Nacional, 1929. p. 498.
7. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2ª ed. São Paulo, Siqueira, 1959, p. 512-3.
8. LOU, Zhi-cen – *General control methods for vegetable drugs: comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias and proposals on their international unification*. [Geneve] WHO, s.d. p. 26-31. (WHO/Pharm./80.502).
9. OLIVEIRA, F. & AKISUE, G. – *Farmacobotânica: curso de identificação de drogas v getais*. São Paulo, s.c.p., 1981. 3v.
10. OLIVEIRA, F. & AKISUE, G. – O problema da adulteração de drogas. *Rev. bras. Farm.*, 54 (2):71-83, 1973.
11. SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O., MENGUE, S.S. MENTZ, L.A., IGANG, B.E. & STEHMANN, J.R. - O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Cad. Farm.*, 1(2):65-72, 1985.
12. VIDAL, J. – Instituto Brasileiro de Estudos e Pesquisas da Flora Medicinal. *Rev. Flora med.*, 1 (3):175-89, 1935.

Recebido para publicação em 1º de setembro de 1988.

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS USUAIS PARA DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO*

Helena Yuco YABIKU **
Nelson Aranha DIAS **
Maristela Satou MARTINS **

RIALA6/658

YABIKU, H.Y.; DIAS, N.A. & MARTINS, M.S. – Estudo comparativo de métodos usuais para determinação de arsênio. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1):51-55, 1989.

RESUMO: Com a finalidade de selecionar o melhor método para a determinação de arsênio em aditivos para alimentos, os autores efetuaram estudo comparativo de três métodos: de Gutzeit, e os colorimétricos, do azul de molibdênio e do dietilditiocarbamato de prata. Os resultados mostraram que o método de Gutzeit é o menos sensível, podendo ser utilizado em determinações semi-quantitativas. Quanto aos métodos do dietilditiocarbamato de prata e o do azul de molibdênio, os maiores desvios foram obtidos na determinação de baixos teores de arsênio. Esses métodos apresentaram aplicabilidade para uma faixa bastante grande de conteúdo de arsênio, sendo que o do dietilditiocarbamato de prata é recomendado para a determinação de baixos teores de arsênio e, o do azul de molibdênio, para teores mais elevados.

DESCRITORES: arsênio em aditivos para alimentos, determinação; aditivos para alimentos, arsênio em, determinação; métodos, estudo comparativo.

INTRODUÇÃO

Os metais são constituintes normais da crosta terrestre e dos oceanos. Sua ocorrência, em forma de traços, também é verificada em todas as plantas e animais, e conseqüentemente, eles podem entrar na cadeia alimentar do homem.

Alguns destes metais, tais como, cobalto, cobre, zinco e manganês desempenham funções vitais e essenciais ao nosso organismo. Outros, porém, em concentrações maiores ou menores, são contaminantes e podem ter efeitos nocivos à saúde da população que os ingerem através dos alimentos. É o caso do arsênio, que pode ocorrer como contaminante acidental nos alimentos, através do seu processamento ou do tratamento agrícola com o uso de pesticidas arseniais.

O arsênio e seus derivados são bastante tóxicos, produzindo doenças agudas ou crônicas. Em

geral, compostos trivalentes de arsênio são mais tóxicos que os pentavalentes⁶.

Uma das preocupações no controle de qualidade das substâncias utilizadas como aditivos para fins alimentícios é a determinação de arsênio. A demanda deste tipo de análise no Instituto Adolfo Lutz é bastante grande e o método utilizado é o de Gutzeit⁷. Este método apresenta várias inconveniências, como a necessidade de usar tiras de papel especial, usualmente importadas, além de ser semi-quantitativo, pois baseia-se na comparação visual entre a mancha obtida com a amostra e as resultantes com padrões de arsênio, ocasionando erros apreciáveis.

A "Association Official Analytical Chemistry" descreve outros métodos para determinação de arsênio, tais como, o do azul de molibdênio e o do dietilditiocarbamato de prata. Nestes métodos, após destruição da matéria orgânica da amostra,

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 10º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, São Paulo, 1987.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

usualmente por via úmida, os compostos de arsênio são transformados em arsina que, em contato com diferentes reagentes, podem ser determinados espectrofotometricamente.

Para avaliar, com maior confiabilidade, os teores de arsênio em análises de rotina em amostras de aditivos destinados a alimentos, foi proposto um estudo comparativo do método de Gutzeit, utilizado no Instituto Adolfo Lutz, com os colorimétricos, do dietilditiocarbamato de prata e do azul de molibdênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas, para avaliação do seu padrão de qualidade, diferentes amostras de aditivos para alimentos, encaminhadas para exame à Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Recuperação do arsênio

Para esta finalidade, a destruição da matéria orgânica foi efetuada por três diferentes procedimentos:

a) Via úmida, com a mistura de H_2SO_4/HNO_3

Material

Béquer de 50 ml
Balão de kjeldahl de 800 ml
Proveta de 200 ml

Reagentes

Ácido sulfúrico p.a.
Ácido nítrico p.a.

Procedimento

Pese exatamente, em um béquer, de 1 a 3g da amostra e adicione a esta uma quantidade conhecida de arsênio. Transfira para um balão de kjeldahl com auxílio de 20 ml de ácido nítrico. Adicione, lentamente, 10 ml de ácido sulfúrico. Aqueça em bico de Bünsen (na capela) até não haver mais desprendimento de vapores de óxido de nitrogênio. Adicione 5 ml de ácido nítrico e aqueça até a solução se tornar incolor. Continue o aquecimento até o aparecimento de fumaças brancas de anidrido sulfúrico. Esfrie. Adicione, cuidadosamente, 20 ml de água desmineralizada. Aqueça até o aparecimento de fumaça branca de anidrido sulfúrico. Esfrie.

b) Via úmida, com H_2SO_4/H_2O_2

Material

Béquer de 10 ml
Balão de Kjeldahl de 800 ml
Proveta de 50 ml

Reagentes

Ácido sulfúrico p.a.
Água oxigenada a 30% p.a. (peridrol)

Procedimento

Proceda como em a, isto é, por via úmida com mistura de H_2SO_4/HNO_3 , variando apenas os reagentes e suas quantidades. Utilize no máximo 10 ml de ácido sulfúrico. A quantidade de água oxigenada a ser utilizada é de 40 ml, podendo ser adicionado um pouco mais, caso necessário.

c) Via seca, com a mistura $MgO/Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Material

Cápsula de porcelana de 50ml
Proveta de 200 ml
Balão de kjeldahl de 800 ml
Balão volumétrico de 1000 ml

Reagentes

Ácido clorídrico 1:1
Mistura de $MgO/Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Dissolva 75 g de MgO e 105 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ em água desmineralizada e complete o volume em balão volumétrico de 1.000 ml. Agite vigorosamente a suspensão e deixe em repouso por 24 horas antes do uso.

Procedimento

Pese, exatamente, de 1 a 3 g de amostra e adicione uma quantidade conhecida de arsênio, seguida de 10 ml de mistura de $MgO/Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Aqueça em bico de Bünsen e, em seguida, coloque na mufla a 550°C até que as cinzas se tornem brancas. Dissolva o resíduo, esfriado, com 1 a 2 ml de água e 10 ml de ácido clorídrico 1:1.

Quantificação do arsênio

Nas amostras mineralizadas pelos três procedimentos descritos, o teor de arsênio foi quantificado, após sua transformação em arsina, mediante reação com zinco metálico e ácido clorídrico, pelos métodos:

a) *Método de Gutzeit*

Princípio: A arsina desenvolvida irá reagir com solução de cloreto de mercúrio impregnada em uma tira de papel, formando uma mancha castanha e cujo tamanho está relacionado com a concentração de arsênio⁵.

b) *Método colorimétrico do azul de molibdênio*

Princípio: A arsina desenvolvida irá reagir com solução de hipobromito de sódio, molibdato de amônio e com solução de sulfato de hidrazina, cuja coloração produzida é medida a 845 nm contra um branco preparado da mesma maneira¹.

c) *Método colorimétrico de dietilditiocarbamato de prata*

Princípio: A arsina desenvolvida irá reagir com uma solução piridínica ou clorofórmica de dietilditiocarbamato de prata, com formação de um complexo de coloração vermelha, cuja intensidade pode ser lida espectrofotometricamente a 525 nm, contra um branco².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das curvas-padrão para determinação de arsênio, pelos métodos de Gutzeit e pelos colorimétricos, são mostrados nas tabelas 1, 2 e 3.

Os dados da tabela 1, referentes ao método de Gutzeit, permitem interpretar os resultados somente apenas dentro de um intervalo de concentração de arsênio.

A tabela 4 apresenta a porcentagem de recuperação de arsênio obtida com os três diferentes procedimentos utilizados para a destruição da matéria orgânica, etapa esta bastante crítica onde requer cuidados especiais. Como pode ser observado, o método por via úmida com H_2SO_4/H_2O_2 foi o que apresentou melhores resultados, onde a recuperação de arsênio variou de 84 a 98%. Este método de mineralização foi o

padronizado para as determinações de arsênio desta pesquisa.

Os teores de arsênio obtidos na análise de 5 amostras de aditivos, pelos métodos já mencionados, estão expostos na tabela 5. Os dados desta tabela mostram que, entre os métodos estudados, o de Gutzeit é o menos sensível, sendo semi-quantitativo, pois a sua quantificação é feita por comparação visual da mancha obtida com uma escala de padrões de arsênio, previamente estabelecida. Além de ser pouco sensível, o método apresenta a inconveniência da necessidade de tira de papel especial, sendo necessária a sua importação.

Quanto aos métodos colorimétricos, do dietilditiocarbamato de prata e do azul de molibdênio, verificamos que os maiores desvios entre os resultados foram encontrados nas amostras com teores mais baixos de arsênio. Isto é compreensível pelo fato de estarmos trabalhando no extremo inicial das duas curvas de calibração, que é a região de menor sensibilidade.

Estes 2 últimos métodos são bastante adequados para a determinação de arsênio sendo que o do azul de molibdênio apresenta aplicabilidade para uma faixa maior de conteúdo de arsênio, em concordância com os resultados obtidos por HOFFMAN & GORDON³. O método do azul de molibdênio é recomendado para níveis de arsênio acima de 12 mg/kg e o do dietilditiocarbamato de prata, para níveis inferiores.

O método de dietilditiocarbamato de prata apresenta maior sensibilidade em relação ao do azul de molibdênio, tendo a vantagem de necessitar quantidades menores de amostra para destruição da matéria orgânica para sua posterior quantificação. Porém, a grande desvantagem deste método é o uso de piridina que, além de ser tóxica, tem odor bastante desagradável, sendo necessário o uso de uma capela com boa exaustão.

Dentre as amostras de aditivos analisadas, duas apresentaram teores de arsênio acima do limite tolerado pela legislação, que é de 3 mg/kg para a maioria deles⁴.

TABELA 1

Escala de teores de soluções de arsênio obtida pelo método de Gutzeit

Altura da mancha (mm)	Teor de arsênio (μ g)
1 - 2	1 - 4
2 - 5	5 - 9
5 - 10	10 - 19
10 - 15	20 - 29
15 - 20	\geq 30

TABELA 2

*Curva-padrão de arsênio obtida pelo método colorimétrico do dietilditiocarbamato de prata**

Absorbância	Teor de Arsênio (µg)	Teor de As ₂ O ₃ (µg)
0,060	1,00	1,32
0,112	2,00	2,64
0,178	3,00	3,96
0,240	4,00	5,28
0,298	5,00	6,60
0,423	7,00	9,24
0,498	8,00	10,56
0,613	10,00	13,20

* Espectrofotômetro Hitachi-Perkin Elmer - Modelo 139.
 Condições experimentais $\lambda = 525$ nm; coarse = 2; fenda = 0,5.

TABELA 3

*Curva-padrão de arsênio obtida pelo método colorimétrico do azul de molibdênio **

Absorbância	Teor de arsênio (µg)	Teor de As ₂ O ₃ (µg)
0,107	7,57	10,00
0,210	15,14	20,00
0,321	22,71	30,00
0,427	30,28	40,00
0,529	37,85	50,00

* Espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 88.
 $\lambda = 845$ nm.

TABELA 4

Teste de recuperação de arsênio pelos três diferentes procedimentos de mineralização da matéria orgânica da amostra

Amostra do aditivo (g)	Adição padrão de arsênio na amostra (µg)	Recuperação (%)		
		Método H ₂ SO ₄ /HNO ₃	Método MgO/Mg(NO ₃) ₂	Método H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂
1,00	1,00	62,0	60,0	83,8
1,00	3,00	65,5	76,6	87,1
1,00	5,00	72,0	87,3	96,0
1,00	10,00	72,4	73,3	97,6

TABELA 5

Teores de arsênio nas amostras de aditivos analisados pelos métodos testados

Amostra	Arsênio (µg/g)			Desvio absoluto	Desvio relativo (%)
	Método de Gutzeit	Método do dietilditiocarbamato de prata	Método do azul de molibdênio		
Carragena	< 1,00	1,72	0,85	0,87	50,6
Urucum + Cúrcuma	< 1,00	ND*	ND**	0,00	0,0
Nitrato de sódio	< 1,00	0,47	0,17	0,30	63,8
Pirofosfato tetrasódico	1,57 - 2,83	3,72	3,56	0,16	4,3
Ácido fosfórico	3,30 - 6,28	7,29	6,73	0,56	7,7

* ND = Não detectado. Sensibilidade do método = 0,1 µg/g.

** ND = Não detectado. Sensibilidade do método = 0,3 µg/g.

CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado, concluiu-se que:

a) O método de destruição da matéria orgânica, via H_2SO_4/H_2O_2 , foi o mais adequado para determinação de arsênio.

b) O método de Gutzeit para a quantificação

do arsênio deverá ser utilizado semi-quantitativamente.

c) Devido às sensibilidades apresentadas, recomenda-se a utilização do método do azul de molibdênio para a determinação de arsênio em níveis acima de 12 mg/kg e o do dietilditiocarbamate de prata para níveis inferiores.

RIALA6/658

YABIKU, H.Y.; DIAS, N.A. & MARTINS, M.S. – Comparative study of the usual methods for the determination of arsenic. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1):51-55, 1989.

ABSTRACT: In order to select the best method for determination of arsenic in food additives, the authors carried a comparative study of the three following methods; Gutzeit, colorimetric procedure of molybdenum blue and the silver diethyldithiocarbamate. The results showed that the Gutzeit method is the least sensitive, so far, utilizing in semi-quantitative determinations. The larger coefficients of variation for silver diethyldithiocarbamate and molybdenum blue methods were obtained in low levels of arsenic determination. These methods are applicable over a much wider range of arsenic contents. Silver diethyldithiocarbamate method is better for determination of low arsenic levels and molybdenum blue for high levels.

DESCRIPTORS: arsenic in food additives, determination; food additives, arsenic determination in; methods, comparative study.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1980. p. 386 (25.010;25011)
2. ESTADOS UNIDOS. National Academy of Sciences. Food and Nutrition Board – *Food chemicals codex*. 3rded. Washington, D.C., National Academic Press, 1981. p. 464-6.
3. HOFFMAN, I. & GORDON, A.D. – Arsenic in foods: collaborative comparison of the arsine-molybdenum blue and the silver diethyldithiocarbamate methods. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 46 (2):245-9, 1963.
4. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, Geneva, 1984 – *Specifications for identity and purity of certain food additives*. Rome, FAO, 1984. p. 17-22 (FAO Food and Nutrition Paper 31/2)
5. 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. 67-70.
6. SAX, N.I. – *Dangerous properties of industrial materials*. 5thed. New York, Van Nostrand/Reinhold, 1979, p. 388-90.

Recebido para publicação em 1^a de novembro de 1988.

EFEITOS DA ESTERILIZAÇÃO SOBRE CATEGUTES SIMPLES. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RADIAÇÃO DO Co60 E SOLUÇÕES QUÍMICAS

Walter ALVES **
Otilia Ferreira NOVO **
Ilcana E.M. FONSECA **
Helena Ide ALVES **

RIALA6/659

ALVES, W.; NOVO, O.F.; FONSECA, I.E.M. & ALVES, H.I. - Efeitos da esterilização sobre categutes simples. Estudo comparativo entre radiação do Co60 e soluções químicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):57-59, 1989.

RESUMO: Foram analisadas 360 amostras de categutes simples esterilizados por radiação gama do Co60, a fim de verificar o efeito da radiação após um período de estocagem superior a dois anos, em termos de degradação protéica. Comparativamente foram estudadas 360 amostras de categutes esterilizados por soluções químicas e verificados os seguintes resultados: todas as amostras estavam estéreis, porém, as esterilizadas por radiação liberaram resíduos de degradação protéica.

DESCRITORES: categute, degradação da proteína por radiação gama; categute, esterilização química, controle.

INTRODUÇÃO

A esterilização por radiação gama do Co60 é um processo simples, cuja única variável em relação aos diversos tipos de produtos a serem esterilizados é o tempo de exposição à fonte radioativa.

Assim, para cada espécie de material a ser esterilizado, é previamente realizado um cálculo para se chegar ao tempo necessário de exposição à fonte radioativa para a perfeita esterilização do mesmo.

Em unidade Cerius a radiação tem a seguinte emissão: $7,4 \times 10^{10}$ raios gama por segundo^{7,9}.

O tempo de exposição à fonte radioativa para categutes é de 5 horas e a dosagem utilizada é de 2,5 Mrad^{7,9}.

Os produtos são levados à fonte da radiação já embalados em caixas de papelão, ou seja, em sua embalagem final. No interior dessas caixas é colocado um dosímetro para controle da radiação utilizada, que consiste num equipamento especial de leitura que indicará a dosagem recebida e permitirá a determinação da qualidade de esterilização^{7,9,10}.

O presente trabalho foi iniciado quando alguns hospitais suspeitaram da contaminação de categutes com mais de dois anos de estocagem, que estavam ocasionando reações indesejáveis em seus pacientes. Na realidade, não se tratava de uma contaminação bacteriana, mas sim da presença de partículas oriundas da esterilização por radiação gama. Realizamos então um estudo comparativo entre categutes esterilizados por radiação e categutes esterilizados por soluções químicas^{4,5,11}.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Sistema de filtragem: porta filtros e suportes para membranas
Filtro de papel com 47 mm de diâmetro e 0,2 μm de porosidade
Microscópio Zeiss, binocular
Estereoscópio
Lâminas para microscópio
Frascos com 100 ml de água destilada estéril com tampa de borracha

Meios de cultura

Meio de tioglicolato fluido^{4,5,11}
Meio de Saboraud modificado^{3,5,11}

Método

Foram analisadas 3 amostras de cada lote de 120 catagutes esterilizados pelo processo de Radiação Gama (grupo A) e 3 amostras de cada lote de 120 catagutes esterilizados por processo químico (grupo B), totalizando 360 amostras de cada grupo^{1,2,3,8}.

Todas essas amostras eram de marcas variadas e nos foram enviadas por diversos hospitais, laboratórios, ou através do Centro de Vigilância Sanitária. Dessas 360 amostras dos grupos A e C, 120 foram utilizadas para análise microscópica para observação de partículas e 240 amostras utilizadas para análise de controle de esterilidade, de acordo com o método da Farmacopéia Brasileira, 3ª edição⁹.

Semearmos 240 bobinas de catagute, previamente liberadas do líquido conservador, respectivamente em 20 ml de meio de Tioglicolato fluido (120 bobinas) e em 20 ml de meio de Saboraud modificado (120 bobinas)^{4,5,11}.

As amostras semeadas em meio de Tioglicolato fluido permaneceram em estufa a 35 – 37°C, e as amostras semeadas em meio de Saboraud modificado ficaram em temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$), por um período de 12 dias.

As bobinas de catagute utilizadas para análise microscópica sofreram o seguinte tratamento: cada bobina foi colocada em um vidro contendo

100 ml de água destilada estéril. sofreu agitação por 5 minutos e posteriormente foi filtrada em membrana de 0,2 μm , para observação dos resíduos aí retidos. Em seguida, as bobinas foram examinadas em estereoscópio e microscópio.

RESULTADOS

Todas as sementeiras realizadas para controle de esterilidade resultaram negativas, portanto, ambos os métodos de esterilização (por irradiação ou pelo método químico) mostraram-se igualmente eficazes, porém todos os fios esterilizados por radiação gama apresentaram liberação de resíduos.

Os exames microscópicos desses resíduos revelaram tratar-se de partículas protéicas oriundas da degradação dos catagutes irradiados.

Os catagutes esterilizados quimicamente nada apresentaram em termos de degradação.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Uma das aplicações mais recentes da tecnologia nuclear é a esterilização de produtos médico-cirúrgicos descartáveis, através da radiação. A esterilização por radiação gama do Co60 é um método que tem sido utilizado no mundo todo, demonstrando ser bastante eficiente; no entanto, ele requer um estudo prévio de cada produto e de seus constituintes para saber os efeitos da radiação sobre o produto final. É importante saber se não ocorrerão mudanças de propriedades nesse produto.

É o caso de fios para sutura cirúrgica que, em virtude de sua constituição protéica na sua origem, sofrem degradação protéica após um período de estocagem longo. Todo nosso estudo foi realizado com amostras com mais de dois anos de fabricação.

Esses resíduos detectados são prejudiciais em quaisquer quantidades porque acarretam perdas importantes nas propriedades de um fio de sutura, como diminuição da resistência e tração, além de ocasionar variação de seu diâmetro, propriedades essas relevantes para a qualificação do fio. Portanto, tal método de esterilização não é adequado a suturas cirúrgicas, visto ocorrer degradação após estocagem prolongada. Tal fato provocará distúrbios indesejáveis em qualquer procedimento cirúrgico hospitalar.

RIALA6/659

ALVES, W.; NOVO, O.F.; FONSECA, I.E.M. & ALVES, H.I. – Effects of sterilization on simple catguts. Comparative study between radiation of Co60 and chemical solutions. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **49**(1):57-59, 1989.

ABSTRACT: This paper describes the effect of Co60 radiation on catguts concerning the protein degradation after two year-storage and the loss of these qualification for surgical procediments.

DESCRIPTORs: catgut, protein degradation by gamma radiation; catgut, chemical sterilization, control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, W; NOVO, O.F. FONSECA, I.E.M. – Métodos para controle físico e biológico de catêgutes simples. Observação sobre o efeito do glioal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **45**(1/2): 85-7, 1985.
2. BREWER, J.H. – Mercurials: inorganic and organic. In: REDDISH, G.F., ed. *Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1954. p. 212-40.
3. DUNS, C.G. – Chemical agents used to prevent the growth of spoilage microorganisms. In: REDDISH, G.F., ed. - *Antiseptics, disinfectants fungicides and chemical and physical sterilization*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1954. p. 567-600.
4. FARMACOPÉIA brasileira. 3ª ed. São Paulo, Andrei, 1977. p. 964-5.
5. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2ª ed. São Paulo, Siqueira, 1959. p. 978.
6. FIFIELD, C.W. – Sterilization, filtration. In: BLOK, S.S., ed. - *Disinfection, sterilization and preservation*. 2nd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. p. 562-11.
7. PROCTOR, B.E. & GOLDBLITH, S.A. – Sterilizin by ionizing radiations. In: REDDISH, G.F., ed. - *Antiseptics, disinfectants, fungicides and physical sterilization*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1954. p. 770-99.
8. SALLE, A.J. – Heavy metals other than mercury and silver. In: REDDISH, G.F., ed. - *Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1954. p. 241-9.
9. SILVERMAN, G.J. & SINSKEY, A.J. – Sterilization by ionizing irradiation. In: BLOCK, S.S., ed. - *Disinfection, sterilization and preservation*. 2nded. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. 542-61.
10. SYKES, G. – *Disinfection and sterilization*. 2nded. London, E. & F.N. Spon, 1965. p. 146-87.
11. The UNITED STATES pharmacopeia. Rockville, Md., United States Pharmacopeial Convention, 1985. p. 1156-60.

Recebido para publicação em 21 de dezembro de 1988.

VALOR DA BACTERIOSCOPIA, CULTURA E IMUNOELETROFORESE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DAS MENINGITES BACTERIANAS *

Carmo Elias Andrade MELLES **
Ilka Maria LANDGRAF **
Maria Lúcia FARACO **
Nereide Borges BOSCARDIN **

RIAL6/660

MELLES, C.E.A; LANDGRAF, I.M.; FARACO, M.L. & BOSCARDIN, N.B. --
Valor da bacterioscopia, cultura e imunoelctroforese cruzada no diagnóstico das meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1):61-67, 1989.

RESUMO: Em período pós-epidêmico de meningite bacteriana foi planejado comparar a possibilidade do exame bacterioscópico, cultura e pesquisa de antígenos polissacarídeos através da imunoelctroforese cruzada (IEC) no diagnóstico dos três agentes etiológicos que aparecem com maior frequência nestas infecções, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Nas 326 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) em que foram identificadas estas bactérias, o exame bacterioscópico foi positivo em 273 (83,74%), a IEC em 273 (83,74%) e a cultura em 207 (63,50%). Para o total de amostras estudadas tivemos igual número de casos diagnosticados pela bacterioscopia e IEC ($p < 0,05$); entretanto, quando comparamos a positividade dos métodos laboratoriais associados entre si, a positividade da bacterioscopia para os três agentes citados (95,33%) supera a da IEC (91,05%) e a da cultura (77,04%) ($p \leq 0,05$). A IEC é um importante método diagnóstico, principalmente quando aplicado em LCR que por qualquer razão é impróprio à bacterioscopia e cultivo de bactérias. Nenhum dos métodos citados deverá ser utilizado em detrimento do outro; a associação dos métodos além de melhorar as possibilidades diagnósticas evitando erros de interpretação, estabelece controle de qualidade no diagnóstico laboratorial.

DESCRIPTORIOS: meningite bacteriana, diagnóstico laboratorial.

INTRODUÇÃO

As meningites bacterianas, apesar do desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, continuam grassando entre nós, com alta incidência. O cuidadoso exame laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR) é o suporte para o diagnóstico e tratamento adequado do paciente.

Na rotina laboratorial, são utilizados para o diagnóstico das meningites o exame bacterioscópico, a cultura e a pesquisa de antígenos polissacarídeos no LCR através da imunoelctroforese cruzada (IEC).

O exame bacterioscópico do LCR é da maior valia pela grande rapidez com que se pode demonstrar o agente bacteriano, a observação de qualquer morfologia bacteriana neste exame é importante para o clínico, pois será guia na escolha inicial do antibiótico para o tratamento^{1,3,7}. O valor diagnóstico do exame bacterioscópico está na dependência de sua correta interpretação, pois mesmo um técnico experiente pode cometer erros de leitura^{17,43}, e também, no número de bactérias contidas no LCR que geralmente, só é positivo quando a concentração for de 10^5 bactérias/mililitro de uma amostra de LCR não centrifugada^{27,38}.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Podem acontecer enganos na interpretação dos resultados da bacterioscopia, pois os microrganismos podem sofrer alterações físico-químicas, provocando desvios na coloração de Gram^{2,4,5}. Outra fonte de erro no diagnóstico pela bacterioscopia é o resultado falso-positivo dado por bactérias não viáveis oriundas de tubos de ensaio contaminados^{3,7,44}, por falhas na limpeza de lâminas de microscopia¹², e por bactérias agregadas à células epidérmicas quando o paciente é punccionado^{2,6}. A frequência com que ocorrem falhas no exame bacterioscópico pode ser da ordem de 10-15%, quando comparado aos resultados obtidos pelo cultivo de bactérias^{3,4,7,25}.

Para o cultivo das bactérias são necessárias várias preocupações que deverão ser tomadas e que possibilitam o crescimento dos microrganismos, sendo indispensáveis os cuidados no transporte e conservação do LCR, bem como, a escolha dos meios de cultura utilizados no diagnóstico bacteriológico. Geralmente, os microrganismos causadores de meningites bacterianas são bastante sensíveis até a pequenas variações de temperatura e teor de umidade^{16,29,45}.

São múltiplos os fatores que podem influir na viabilidade das bactérias, principalmente do meningococo, como o volume de LCR semeado⁴⁰, sua composição², condições de conservação e transporte^{10,34,35}, e ainda a ação da antibioticoterapia prévia à punção^{30,31,33,36}. Devido a estes fatores são recomendados exames imunológicos como complementares no diagnóstico das meningites bacterianas, entre os quais utiliza-se, principalmente, a imunoelectroforese cruzada (IEC) na pesquisa de antígenos⁵ bacterianos eventualmente presentes no LCR^{13,15,42}.

A IEC pode ser empregada na pesquisa de antígenos polissacarídeos de *N. meningitidis*^{9,10,20}, de *S. pneumoniae* e de *H. influenzae*^{11,23,24}. Esta metodologia foi padronizada entre nós e demonstrou grande sensibilidade e especificidade^{6,38,39,41}.

Algumas restrições são feitas ao uso desta prova imunológica relacionadas ao aparecimento eventual de resultados falsos, devidos a reações cruzadas entre gêneros e espécies^{14,19,29,32}. Saliênta-se que o valor da imunoelectroforese cruzada no diagnóstico das meningites bacterianas depende inteiramente da qualidade dos reagentes e do anti-soro empregados na reação⁶.

Em publicação anterior MELLES et alii³³, fazendo estudo de métodos comparativos de diagnóstico das meningites bacterianas, dentro do período epidêmico causado pela *N. meningitidis* e obedecendo a todos os parâmetros já mencionados nos cuidados com o LCR, empregaram, com sucesso, além dos métodos laboratoriais citados

acima, a pesquisa de anticorpo pela hemaglutinação passiva. O presente trabalho visa analisar a metodologia utilizada para o diagnóstico das meningites bacterianas através dos resultados obtidos na rotina diagnóstica de nosso laboratório em período pós epidêmico quando houve maior variedade de agentes etiológicos diagnosticados quando comparado com o período epidêmico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Em período de aproximadamente 12 meses, de 1981-1982, foram analisadas 641 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de meningite bacteriana. Os LCR foram provenientes do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, e os exames laboratoriais foram processados nas Seções de Bacteriologia e Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Métodos

A metodologia seguida para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas foi a recomendada pelo Centro de Referência Nacional para Meningites, Instituto Adolfo Lutz - Ministério da Saúde⁵.

Os anti-soros aglutinantes e precipitantes para *N. meningitidis* e *H. influenzae* foram preparados no Instituto Adolfo Lutz. Os de *S. pneumoniae* foram provenientes do "Stats Serum Institut", Copenhagem, Dinamarca.

RESULTADOS

Das 641 amostras de LCR, examinadas no período indicado, 326 foram positivas sendo que 145 o foram para *N. meningitidis*, 98 para *S. pneumoniae* e 83 para *H. influenzae*, através dos exames bacterioscópico, cultura e IEC. Estes resultados estão expostos na tabela nº I, na qual verificamos que, para estes agentes citados, a IEC foi o exame laboratorial que, quando usado separadamente, obteve o maior índice de positividade, ou seja, 11,96% do total das amostras. Em seguida vem a bacterioscopia com 7,97% e a cultura com 1,23%. Quando a IEC foi utilizada em combinação ou associada à bacterioscopia e à bacterioscopia mais cultura, a positividade passou a ser 16,56% para a primeira combinação e 52,15% para a segunda.

Nos resultados obtidos para os agentes isoladamente, verificamos que, no diagnóstico do *H. influenzae*, a IEC corresponde à segunda maior frequência de positividade, o mesmo acontecendo para o meningococo quando esta prova foi associada à bacterioscopia.

Relacionando o número de vezes e o percentual com que cada método laboratorial apresentou positividade nas 326 amostras de LCR, verificamos, na tabela nº 2, que a cultura foi o exame de mais baixa positividade para o conjunto de agentes etiológicos diagnosticados (63,50%). Quando consideramos a bacterioscopia e IEC para este mesmo conjunto de bactérias, verificamos o mesmo percentual de positividade (83,74%) com $p < 0,05$ independente da presença de fatores impeditores no LCR. Ainda, nesta tabela, constatamos, nos agentes bacterianos isoladamente, discreta superioridade da bacterioscopia sobre a IEC, quando a bactéria identificada foi o meningococo (84,14% - 82,75%). O inverso, com considerável superioridade (71,08% - 95,18%), aconteceu para o *Haemophilus* porque o seu diagnóstico presuntivo de gênero não poderia ser dado simplesmente pela bacterioscopia; os dados considerados foram os da soma das amostras em que a bacterioscopia foi positiva juntamente com a cultura e ou IEC. Para o pneumococo, a tabela mostra que foi evidente a superioridade da bacterioscopia na visualização da sua morfologia característica (93,87% - 75,51%). O valor da cultura foi o mesmo que da IEC na sua identificação (75,51%).

Tomando somente aquelas amostras de LCR em que a etiologia bacteriana foi esclarecida quando houve associação dos métodos laboratoriais,

ou seja, em 257 (78,83%) das 326 amostras totais positivas, verificamos que, independentemente da presença de elementos impeditores no LCR, o agente etiológico foi identificado pela combinação parcial ou total de bacterioscopia, cultura e IEC. Considerando separadamente o diagnóstico de cada agente etiológico verificamos que, através dessa associação, o meningococo foi identificado em 106 (73,10%) das 145 amostras positivas para meningococo, o pneumococo em 87 (88,77%) das 98 amostras positivas para pneumococo e o *H. influenzae* em 64 (77,10%) das 83 amostras positivas para esta bactéria (tabela 3).

Comparando isoladamente cada método laboratorial participante dessa associação, pudemos verificar que a bacterioscopia foi positiva em 95,33% das oportunidades de exames realizados, a IEC em 91,05% e a cultura em 77,04% com $p < 0,05$.

Como pode ser verificado ainda, na tabela 3, a concordância dos resultados positivos para a bacterioscopia quando em associação, ou seja, quando confirmada pela IEC ou cultura foi de 95,28% nas amostras de LCR positivas para meningococo; de 100,00% para o pneumococo, e de 92,18% para o *H. influenzae*. Em relação à IEC, a concordância de resultados foi de 98,11% para o meningococo, 79,31% para o pneumococo e para o *H. influenzae* foi de 95,31%.

TABELA 1

Identificação da N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae pela bacterioscopia, imunoelectroforese cruzada e cultura, isoladamente e nas várias combinações

Agente etiológico no LCR Exame Laboratorial	<i>N. meningitidis</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>H. influenzae</i>		Total	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Bacterioscopia	21	(14,5)	5	(5,1)	-	-	26	(7,97)
Imunoelectroforese cruzada	16	(11,0)	5	(5,1)	18	(21,7)	39	(11,96)
Cultura	2	(1,4)	1	(1,0)	1	(1,2)	4	(1,23)
Bacterioscopia + I.E.C.	34	(23,4)	14	(14,3)	6	(7,2)	54	(16,56)
Bacterioscopia + Cultura	2	(1,4)	18	(18,4)	3	(3,6)	23	(7,06)
Cultura + I.E.C.	5	(3,4)	-	-	5	(6,0)	10	(3,07)
Bacterioscopia + cultura + I.E.C.	65	(44,9)	55	(56,1)	50	(60,3)	170	(52,15)
Total de casos	145	(100,00)	98	(100,00)	83	(100,00)	326	(100,00)

I.E.C. = Imunoelectroforese cruzada.

TABELA 2

Positividade dos três métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico da *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*

Exame laboratorial \ Agente etiológico no LCR	<i>N. meningitidis</i> (145 amostras)		<i>S. pneumoniae</i> (98 amostras)		<i>H. influenzae</i> (83 amostras)		Total (326 amostras)	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Bacterioscopia	122	(84,14)	92	(93,87)	59	(71,08)	273	(83,74)
Imunoelectroforese cruzada	120	(82,75)	74	(75,51)	79	(95,18)	273	(83,74)
Cultura	74	(51,03)	74	(75,51)	59	(71,08)	207	(63,50)

TABELA 3

Número e percentual de vezes em que os três métodos laboratoriais foram positivos, quando em associação parcial ou total no diagnóstico dos três agentes etiológicos estudados

Exame laboratorial \ Agente etiológico no LCR	<i>N. meningitidis</i> (106 amostras 73,10%)		<i>S. pneumoniae</i> (87 amostras 88,77%)		<i>H. influenzae</i> (64 amostras 77,10%)		Total (257 amostras 78,83%)	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Bacterioscopia	101	(95,28)	87	(100,00)	59	(92,18)	245	(95,33)
Imunoelectroforese cruzada	104	(98,11)	69	(79,31)	61	(95,31)	234	(91,05)
Cultura	67	(63,20)	73	(83,90)	58	(90,65)	198	(77,04)

DISCUSSÃO

No período estudado as meningites bacterianas diagnosticadas por nosso laboratório foram causadas por número razoável de diferentes bactérias, tendo na *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* os agentes etiológicos predominantes, seguidos por enterobactérias, cocos Gram-positivos, excetuando o pneumococo, *Listeria monocy-*

togenes e microbactérias. Foram, separados para este estudo os três primeiros agentes citados por serem considerados como de difícil diagnóstico laboratorial devido a suas exigências nutricionais, de manutenção e sensibilidade a condições diversas.

Os resultados obtidos através da bacterioscopia (tabela 1) evidenciam pouca segurança no

diagnóstico presuntivo do *H. influenzae*, razão porque a IEC deve ser o método de escolha no diagnóstico das meningites causadas por esse agente etiológico. Ainda, que o aumento do percentual de positividade, obtido pela associação dos métodos bacterioscópico-IEC e, principalmente, bacterioscopia-cultura e IEC, permite inferir que esta associação de métodos deverá ser utilizada para o diagnóstico laboratorial das meningites suspeitas clínica e epidemiologicamente de serem causadas por estes três agentes bacterianos escolhidos.

Deve ser comentado, segundo os resultados obtidos (tabela 2) que, no total de amostras estudadas, ou seja, naquelas em que foram identificados um dos três agentes etiológicos, o percentual de positividade para a bacterioscopia e IEC, quando empregados isoladamente, foi o mesmo, levando à assertiva de que não há distinção na escolha de um determinado método laboratorial a ser utilizado no diagnóstico destas meningites causadas por estes três agentes bacterianos.

Quando consideramos o número e o percentual de vezes em que os exames laboratoriais foram positivos (tabela 3) e quando utilizamos somente a combinação dos métodos laboratoriais, podemos inferir dos resultados que a bacterioscopia foi o método mais sensível, seguido da IEC e finalmente a cultura.

Ficou evidente, nas amostras de LCR em que foram identificados qualquer destes três agentes bacterianos, que estes resultados foram obtidos em 78,84% das vezes por combinação da bacterioscopia, IEC e cultura e os restantes resultados foram obtidos por cada um dos métodos quando realizados isoladamente. Dados semelhantes ou próximos foram obtidos por MELLES et alii³³, quando trabalharam com amostragem de LCR obtida dentro do período epidêmico da doença meningocócica quando, obviamente, o agente etiológico predominante foi o meningococo.

Quanto ao resultado do diagnóstico do *H. influenzae*, em que a positividade da IEC foi alta, praticamente o dobro em relação a *N. meningitidis*, demonstrando a importância do uso desse método imunológico, deve ser lembrado insistentemente que a bacterioscopia isoladamente não se prestou ao diagnóstico de gênero no caso deste agente, e a confirmação bacterioscópica desta bactéria visualizada no esfregaço só foi válida quando a cultura ou a IEC resultaram positivas. Não há dúvida, segundo nossa experiência, de que nos casos de meningites purulentas com bacterioscopia exaustivamente negativa e diagnóstico pendente da cultura e, ainda, para LCR conservados e transportados inadequadamente, a IEC é o método de escolha, não só pela facilidade de implantação da

técnica como pela sensibilidade e rapidez no seu processamento.

Os resultados apresentados decorrentes da metodologia usada são tecnicamente perfeitos dentro dos conhecimentos e possibilidades técnico-científicas atuais, e qualquer eventual falha seria por causas fora de nosso controle, como por exemplo, na visualização durante o exame bacterioscópico de alguns bacilos Gram-negativos que não tiveram confirmação posterior com crescimento da bactéria na cultura ou seus antígenos não foram detectados na IEC, resultando que não poderiam ser enquadrados dentro do gênero, pois tanto poderia ser uma enterobactéria como um hemófilo.

Como foi extensamente relatado na introdução deste trabalho, algumas falhas que poderiam ocorrer nos exames por conta de deficiências na limpeza, manutenção de lâminas, tubos de ensaio e outros, durante a colheita e transporte do material, estão completamente afastadas porque todos os detalhes foram aventados durante o planejamento do trabalho, incluindo o uso dos corantes filtrados no momento do uso e parâmetros adotados na leitura das lâminas; se persistisse qualquer dúvida, a orientação foi para que "seria preferível o resultado negativo a um falso positivo".

Em relação aos anti-soros específicos usados para pesquisa de antígenos de polissacarídeos, através da IEC, estes foram por nós produzidos e testados sobre sua validade com controle de qualidade usando cepas e antígenos padrões. O anti-soro para *S. pneumoniae* foi fornecido por laboratório estrangeiro de alto padrão técnico-científico.

Finalmente, tendo em vista a importância e o desempenho de cada exame e as dificuldades encontradas e inerentes a cada método laboratorial, não temos dúvidas em estabelecer como parâmetro os três métodos empregados, dois bacteriológicos e o imunológico, no diagnóstico das meningites bacterianas causadas, em especial, pelos três agentes etiológicos estudados. Esta afirmativa baseia-se no fato de que os três métodos citados se completam, como demonstrado pela concordância dos resultados por nós obtidos neste trabalho, com número apreciável de amostras de LCR procedentes de pacientes com meningite bacteriana.

Deve, ainda, ser assinalado que nossos resultados são referentes a estudo prospectivo das meningites purulentas ou bacterianas realizado em período pós-epidêmico, representando desta maneira período de normalidade epidemiológica quando relacionado ao período anormal epidêmico. Ademais, que a maioria dos trabalhos nacionais existentes na literatura especializada^{38,39,41}, sobre o emprego do método imunológico comparado ou não com os métodos bacterioscópicos, é informativa sobre determinada bactéria isoladamente.

RIALA6/660

MELLES, C.E.A.; LANDGRAF, I.M.; FARACO, M.L. & BOSCARDIN, N.B. – Bacterioscopy, culture and counterimmunoelectrophoresis (IEC) values in the diagnosis of bacterial meningitis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):61-67, 1989.

ABSTRACT: In a post-epidemic period of bacterial meningitis, a comparative study by means of bacterioscopic analysis, culture and counterimmunoelectrophoresis (C.I.E.) of cerebrospinal fluid (C.S.F.) the three most frequent bacterias were *Neisseria Meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. From 326 cases considered, the bacterioscopic analysis was positive in 273 of them (83.74%), C.I.E. in 273 (83.74%) and culture in 207 (63.50%). In the total of the samples, the number of cases identified by bacterioscopic observation and by C.I.E. was just the same ($p < 0,05$) but when the three methods were compared in association the positivity of the bacterioscopic analysis was higher (95.33%) than C.I.E. (95.05%) and than culture (77.04%) ($p < 0,05$), C.I.E. is the most important diagnostic tool, chiefly when the usefulness of the other tests in CSF is not reliable, because of some technical reasons. None of these methods should be employed alone; therefore, when they are employed all together they may lead to a best diagnosis, that means to avoid interpretation error, and the best quality control for the diagnostic tools.

DESCRIPTORS: meningitis, bacterial, laboratorial diagnosis.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACAR, J.F.; DUVAL, J.; PEROL, Y. & VERGEZ, P. – Le diagnostic dans les maladies bactériennes. *Rev. Prat.*, 17:1151-63, 1967.
2. AGBAYANI, M.M.; BRAUN, J.; CHANG, C.T.; GLASS, L. & EVANS, H.E. – Effect of CSF on bacterial growth. *Arch. Neurol.*, 38(1):43-5, 1981.
3. AMAR, R.; TOLEBEM, G.; SICRE, M.G.; LEMELAND, J.F.; LEROY, J. & HUMBERT, G. – Les meningites purulentes en Haute Normandie à propos d'une statistique hospitalière de 106 cas. *Lyon. med.*, 228 (18):517-25, 1972.
4. BHUSHAN, V. & CHINTU, C. – Changing pattern of pyogenic meningitis in Lusaka. *East. afr. med. J.*, 56(11):548-56, 1979.
5. 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).
6. CARONARE, S.B.; TAKEDA, A.K.; JORDÃO, F.B.M. & TAUNAY, A.E. – Especificidade imunológica dos polissacarídeos extraídos de diferentes grupos de *Neisseria meningitidis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34:119-25, 1974.
7. CARPENTER, R.P. & PETERSDORF, R.G. – The clinical spectrum of bacterial meningitis. *Amer. J. Med.*, 33(2):262-75, 1962.
8. COLDING, H. & LUND, J. – Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of bacterial meningitis. *J. clin. Microbiol.*, 5(4): 405-9, 1977.
9. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. – Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *Lancet*, 1 (7761):1154-57, 1972.
10. EDWARDS, E.A. – Immunologic investigation of meningococcal disease I Group-specific *Neisseria meningitidis antigens present in the serum of patients with fulminant meningococemia*. *J. Immunol.*, 106 (2): 314-7, 1971.
11. EDWARDS, E.A.; MUEHL, P.M. & PECKIN-PAUGH, R.O. – Diagnosis of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *J. Lab. clin. Med.*, 80(3): 449-54, 1972.
12. ERICSSON, C.D.; CARMICHAEL, M.; PICKERING, L.K.; MUSSET, R. & KOHL, S. – Erroneous diagnosis of meningitis due to false-positive Gram stains. *med. J.*, 71(12):1524-5, 1978.
13. EVANS-JONES, L.G. – Difficulties in diagnosing meningococcal meningitis. *Brit. med. J.*, 1(6167):892-3, 1979.
14. FINCH, C.A. & WILKINSON, H.W. – Practical considerations in using C.I.E. to identify the principal causative agents of bacterial meningitis. *J. clin. Microbiol.*, 10(4):519-24, 1979.
15. FOSSIECK, B.J.; CRAIG, R. & PATERSON, P.Y. – Counterimmunoelectrophoresis for rapid diagnosis of meningitis due to *Diplococcus pneumoniae*. *J. infect. Dis.*, 127(1):106-9, 1973.
16. FRANTZ, I.D. – Growth requirements of the meningococcus. *J. Bacteriol.*, 43 (6): 757-61, 1942.
17. GEISELER, P.J.; NELSON, K.E.; LEVIN, S.; REDDI, K.T. & MOSES, V.K. – Community acquired purulent meningitis: a review of 1,316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev. infect. Dis.*, 2(5):725-44, 1980.
18. GONZALES, A.F. – Consideraciones sobre diagnóstico de las meningites, por análisis del L.C.R. *Rev. Sanid. Hig. publ.*, 45(6):659-72, 1971.
19. GREENWOOD, B.M. & WHITTLE, H.C. – Antigen-negative meningitis due to group A *Neisseria meningitidis*. *J. infect. Dis.*, 129 (2):201, 1974.

20. GREENWOOD, B.M.; WHITTLE, H.C. & DOWNIC, O.R. - Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*, 2(7723):519, 1971.
21. HAGGERTY, R.J. & ZIAI, M. - Acute bacterial meningitis. *Adv. Pediat.*, 13:129-81, 1964.
22. HYSLOP, N.E. & SWARTZ, M.N. - Bacterial meningitis. *Postgrad. Med.*, 58(3):120-8, 1975.
23. INGRAN, D.L.; ANDERSON, P. & SMITH, D.H. - Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of systemic disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Pediat.*, 81:1156-59, 1972.
24. JARVIS, C.W. & SAXENA, K.M. - Does prior antibiotic treatment hamper the diagnosis of acute bacterial meningitis? An analysis of a series of 135 childhood cases. *Clin. Pediat.*, 11(4):201-4, 1972.
25. JONES, R.G. - Bacterial meningitis. Part. I. Incidence and diagnosis. *S. Afr. med. J.*, 41:75-9, 1967.
26. JOYNER, R.W.; IDRIS, Z.H. & WILFERT, C.M. Misinterpretation of cerebrospinal fluid Gram stain. *Pediatrics*, 54(3):360, 1974.
27. La SCOLEA, L.J. Jr., & DRYJA, D. - Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J. clin. Microbiol.*, 19(2):187-90, 1984.
28. LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSER JR., W.J. & TRUANT, J.P. - *Manual of clinical microbiology*. 3. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. 1,044 p.
29. LEWIN, E.B. - Partially treated meningitis. *Amer. J. Dis. Child.*, 128: 145-7, 1974.
30. LORIAN, V. & ATKINSON, B. - Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Amer. J. clin. Pathol.*, 64(2):678-88, 1975.
31. LORIA, D.; KAMINSKI, T.; GRIECCO, M. & SINGER, J. - Aberrant forms of bacteria and fungi found in blood or cerebrospinal fluid. *Arch. intern. Med.*, 124:39-48, 1969.
32. MANDAL, B.K. - The dilemma of partially treated bacterial meningitis. *Scand. J. infect. Dis.*, 8(3):185, 1976.
33. MELLES, C.E.A.; RAMIRES, M.R.N.; DINIZ, J.M.P.; ADELINO, M.G.F.; TAUNAY, A.E. & ROSSI, C.V. - Estudo comparativo de métodos diagnósticos das meningites purulentas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20(4): 202-7, 1978.
34. MILLAN, Y.; MENARD, M. & VANDEKERKOVE, M. - Isolement des meningocoques de sérotype A: influence de la durée et des conditions de conservation des liquides céphalorachidiens sur les résultats des cultures. *Bull. Org. mond. Santé*, 43(5): 743-9, 1970.
35. MITCHELL, M.S. - Immunofluorescent techniques for demonstrating bacterial pathogens associated with cerebrospinal meningitis II - Growth, viability and immunofluorescent staining of *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *Diplococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid. *J. Lab. clin. Med.*, 65(6):990-1003, 1965.
36. MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A. & SWANN, M.B.R. - A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, 29(4): 407-15, 1926.
37. MUSER, D.M. & SCHELL, R.F. - False-positive Gram stains of cerebrospinal fluid. *Ann. intern. Med.*, 79(4):603-4, 1973.
38. PALHARES, M.; GELLI, D.S.; ALMEIDA, M.C.R.; MELLES, C.E.A.; TAKEDA, A.K. & TAUNAY, A.E. - Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido-céfalorraquidiano por imunoeletroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33:85-9, 1973.
39. PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. - Detecção de Ags polissacarídeos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em LCR pela imunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42-1982.
40. RORKE, E.M. - Valuable but neglected technique for the culture of aerobic organisms from cerebrospinal fluid. *J. clin. Pathol.*, 18:385, 1965.
41. TAKEDA, A.K.; UMEKITA, L.F.; BOSCARDIN, N.B.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. - Imunoeletroforese cruzada no diagnóstico da meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):165-9, 1979.
42. TOBIN, B.M. & JONES, D.M. - Immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *J. clin. Pathol.*, 25:583, 1972.
43. WELLMAN, W.E. - Bacterial meningitis. *Postgrad. Med.*, 42:7-14, 1967.
44. WENSTEIN, R.A.; BANER, F.W.; HOFFMAN, R.D.; TYLER, P.G.; ANDERSON, R.L. & STAMM, W.E. - Factitious meningitis: diagnostic error due to nonviable bacteria in commercial lumbar puncture trays. *J. amer. med. Assoc.*, 233(8):878-9, 1975.
45. WILSON, F.M. & LERNER, A.M. - Etiology and mortality of purulent meningitis at the Detroit receiving hospital. *New Engl. J. Med.*, 271(24): 1235-38, 1964.

CORRELAÇÃO ENTRE GIARDÍASE E GRUPO SANGÜÍNEO (SISTEMA ABO) NO MUNICÍPIO DE SÃO CAETANO DO SUL, SP*

Domingas Maria A. G. Vieira TORRES**
Maria Isabel de OLIVEIRA **
Terume O. FUZIHARA **
Rosa Maria Donini Souza DIAS **
Ana Célia S. MANGINI **
José Leopoldo Ferreira ANTUNES **
Fernando M. Azevedo CORRÊA ***

RIALA6/661

TORRES, D.M.A.G.V.; OLIVEIRA, M.I.; FUZIHARA, T.O.; DIAS, R.M.D.S.; MANGINI, A.C.S.; ANTUNES, J.L.F. & CORRÊA, F.M. A. - Correlação entre giardíase e grupo sangüíneo (Sistema ABO) no Município de São Caetano do Sul, SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1): 69-73, 1989.

RESUMO: Foram analisadas amostras de fezes e sangue de 580 escolares do Município de São Caetano do Sul, São Paulo, com vistas ao estudo da frequência de giardíase naquele grupo populacional e sua correlação com o Sistema ABO. Foi testada, através de metodologia estatística, a hipótese aventada pela literatura especializada, segundo a qual a giardíase apresentaria incidência mais elevada entre os indivíduos do grupo sangüíneo A. Foram utilizados como grupos controle o conjunto de escolares incluídos na investigação e a população das cidades de São Paulo e Santo André. Ao exame parasitológico de fezes, verificou-se que 102 (17,59%) escolares estavam parasitados por *Giardia lamblia*; 166 (28,62%) apresentavam outras enteroparasitoses, e 312 (53,79%) não manifestaram quaisquer infecções parasitárias. A distribuição por grupo sangüíneo dos escolares com giardíase não variou significativamente ($p > 0,05$) em relação à mesma distribuição dos grupos populacionais selecionados para controle. Tais resultados diferem daqueles divulgados por outras comunicações científicas, e indicam a necessidade de novos e mais extensos levantamentos populacionais, bem como estudos imunológicos, que confirmem ou descartem definitivamente a hipótese em questão.

DESCRITORES: giardíase, correlação com grupos sangüíneos; grupos sangüíneos (Sistema ABO), correlação com giardíase; giardíase, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de diferentes grupos sangüíneos na população, segundo os geneticistas, é um exemplo de polimorfismo¹¹. Em alguns países foram publicadas, recentemente, comunicações científicas sugerindo como possível a correlação entre a distribuição populacional por grupos sangüíneos e a incidência de afecções gastrintestinais⁹. Também, no Brasil, há pesquisadores que

têm procurado demonstrar essa hipótese do ponto-de-vista epidemiológico. GUIMARÃES *et alii*⁷, em estudo comparativo compreendendo raça, sexo, antígenos eritrocitários e doença de Chagas, concluíram não haver distribuição preferencial dessa doença quanto às variáveis citadas. Outros autores^{1,13} procuraram verificar se existia correlação entre enteroparasitoses e o Sistema ABO, com especial atenção à giardíase. A literatura especializada, no Brasil e no exterior, indica

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Laboratório de Zoonoses Parasitárias do Instituto Butantã, São Paulo, SP.

maior prevalência de infecção por *Giardia lamblia* entre os indivíduos do grupo sanguíneo A^{1,13}.

O Instituto Adolfo Lutz, no exercício de suas atribuições sanitárias, tem realizado inquéritos epidemiológicos em diferentes regiões do Estado de São Paulo³, visando conhecer a difusão das diversas infecções parasitárias em nosso meio. O trabalho que ora se apresenta teve por objetivos determinar o índice de frequência da giardíase em segmento de população residente no Município de São Caetano do Sul, SP, e relacioná-la com os grupos sanguíneos prevalentes nos indivíduos examinados.

MATERIAL E MÉTODOS

De agosto a dezembro de 1986, foram coletadas amostras de sangue e fezes de 580 escolares de dois grupos escolares e duas creches localizadas no Município de São Caetano do Sul, São Paulo.

Em sua grande maioria, os escolares incluídos no levantamento haviam nascido no local ou em outros Municípios do Estado de São Paulo, e pertenciam a nível sócio-econômico baixo, além de apresentarem carências nutricionais. Eram quase todos brancos (91,90%), e poucos descendiam de famílias nordestinas. Suas idades variaram de 3 a 23 anos, e a divisão, quanto ao sexo, registrou 301 (51,90%) escolares do sexo feminino e 279 (48,10%) do masculino.

Antes de serem colhidos os materiais, foram realizadas palestras com os pais e mestres dos escolares, visando esclarecê-los sobre os objetivos e a importância da investigação, sendo incluídas no estudo somente as crianças cujos pais haviam concedido sua autorização expressa.

Os escolares foram orientados para que trouxessem as fezes em latinhas apropriadas ao transporte. As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa asséptica em tubos denominados "vacutainer", contendo heparina. Para cada

amostra de sangue, após cuidadosa homogeneização, foi realizada a tipagem sanguínea de acordo com o método de Beth-Vincent, descrito por LIMA¹⁰.

Para os exames parasitológicos de fezes, foram utilizadas as técnicas de sedimentação espontânea (HOFFMAN *et alii*⁶) e a técnica de FAUST *et alii*⁵. Quando as fezes apresentavam consistência diminuída, foi utilizado, também, o método do exame direto. Para a leitura de cada preparação foram feitas duas lâminas, e os exames de fezes foram executados sempre por dois técnicos, com a finalidade de tentar eliminar erros individuais nas determinações laboratoriais.

Os dados levantados foram dispostos em tabelas e, para verificar a significância de sua variação ante os padrões amostrais selecionados para controle, foi aplicado o método estatístico¹² do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Os exames parasitológicos de fezes revelaram que 102 (17,59%) dos escolares estavam parasitados por *G. lamblia*, 166 (28,62%) tiveram identificada a presença de outros enteroparasitas, e 312 (53,79%) não apresentaram quaisquer infecções parasitárias. Todos os escolares infectados foram encaminhados para atendimento médico nos Postos de Saúde da região, onde foram devidamente medicados.

A tabela 1 mostra a distribuição dos escolares incluídos no estudo, de acordo com a faixa etária e a ocorrência de infecção parasitária por *G. lamblia*. Mostra, ainda, os índices de frequência da infecção para cada faixa etária considerada.

Pode-se também observar, na tabela 1, que os índices de frequência foram mais elevados para os grupos mais jovens. A distribuição por faixa etária dos escolares infectados variou significativamente ($p < 0,001$) em relação à distribuição por faixa etária do conjunto de escolares incluídos no levantamento, distribuição considerada padrão amostral para fins de controle.

TABELA 1

Distribuição dos escolares de São Caetano do Sul, SP, por faixa etária e frequência da giardíase

Faixa etária (anos)	Escolares com giardíase		Total de escolares investigados		Índices de frequência
	Nº	%	Nº	%	%
3 5	35	34,31	101	17,41	34,65
6 8	27	26,47	136	23,45	19,85
9 11	24	23,53	152	26,21	15,79
12 14	14	13,73	159	27,41	8,81
15 17	2	1,96	29	5,00	6,90
18 ou mais	0	0,00	3	0,52	0,00
Total	102	100,00	580	100,00	—

A tabela 2 sintetiza o resultado da pesquisa de anticorpos eritrocitários nas amostras de sangue dos 580 escolares analisados, e, em destaque, dos 102 escolares parasitados por *G. lamblia*. Foram incluídos, ainda, dados colhidos na literatura especializada, mostrando a distribuição populacional por tipo sanguíneo das cidades de São Paulo e Santo André, para fins de análise comparativa.

Pode-se, também, verificar que a distribuição por grupo sanguíneo do total de escolares investigados não variou significativamente ($p > 0,05$) em relação às distribuições populacionais das cidades de São Paulo⁴ e Santo André², tomadas por padrões amostrais de controle, de onde se infere a representatividade do universo amostral sobre a população de São Caetano do Sul.

TABELA 2

Distribuição dos escolares de São Caetano do Sul, SP, segundo o grupo sanguíneo (Sistema ABO) e padrões amostrais de controle

Grupo sanguíneo	Escolares com giardíase		Total de escolares investigados		População de São Paulo		População de Santo André	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
O	42	41,18	253	43,62	1902	47,81	548	45,74
A	45	44,12	243	41,90	1563	39,29	477	39,82
B	13	12,74	63	10,86	398	10,01	125	10,43
AB	2	1,96	21	3,62	115	2,89	48	4,01
Total	102	100,00	580	100,00	3978	100,00	1198	100,00

A distribuição dos escolares com giardíase por grupo sanguíneo também não variou significativamente ($p > 0,05$) em relação à distribuição do conjunto de escolares investigados, nem em relação à distribuição populacional das cidades de São Paulo e Santo André, adotados como padrões amostrais de controle. Pode-se então verificar que não houve correlação entre a frequência da giardíase e a distribuição populacional por grupo sanguíneo no presente levantamento.

A tabela 3 mostra que, para os escolares parasitados que pertenciam ao grupo sanguíneo A, foi registrado um índice de frequência (18,52%) ligeiramente superior ao valor médio (17,59%) e ao valor encontrado para os demais grupos sanguíneos, cuja média ponderada registrou 16,91%. Essas diferenças, entretanto, estariam previstas num padrão de variação estatística que pode ser considerado normal e não significativo ($p > 0,05$).

TABELA 3

Índices de frequência da giardíase em Escolares de São Caetano do Sul, SP, entre os diversos grupos sanguíneos (Sistema ABO)

Grupo sanguíneo	Escolares com giardíase	Índices de frequência
O	42	16,60
A	45	18,52
B	13	20,63
AB	2	9,52
Total	102	—

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

BARNES & KAY¹ sugerem que, na superfície de *Schistosoma* sp. adulto, existam antígenos que se recombinam com substâncias do sangue do hospedeiro. Desse modo, as diferentes composições dos grupos sanguíneos pertencentes ao Sistema ABO poderiam favorecer ou dificultar a reprodução daquele helminto. Sugerem, também, que um mecanismo similar pudesse ocorrer com a *G. lamblia* e indicam, em seus estudos, maior prevalência de giardíase nos indivíduos do grupo sanguíneo A.

Estudos epidemiológicos realizados em Recife, Pernambuco, por ZISMAN *et alii*² concluíram haver correlação entre a giardíase e o Sistema ABO, após terem determinado um índice de frequência que foi mais elevado para os indivíduos do grupo sanguíneo A.

Além dos estudos citados, GLOBER *et alii*⁶ asseveram que dentre os pacientes com câncer gástrico pôde ser registrado um percentual mais elevado de indivíduos do grupo sanguíneo A, apesar de não ter sido observada a ocorrência de correlação entre a distribuição por tipo sanguíneo

(Sistema ABO) ou fator Rh e a origem do tumor, a idade e o sexo dos pacientes.

Tais estudos evidenciam-se ainda mais relevantes quando consideramos que o tipo sanguíneo A é um dos mais freqüentes em nosso meio.

Nossos resultados diferem daqueles divulgados por outros pesquisadores, pois permitem afirmar, do ponto-de-vista estatístico, que, para a população estudada, a maior freqüência de indivíduos com giardíase não está necessariamente relacionada com o Sistema ABO. A partir dessas observações, sugerimos a realização de levantamentos mais extensos e de estudos imunológicos, para que se possam dirimir as incertezas sobre essa questão, permitindo, assim, confirmar ou descartar definitivamente a hipótese da correlação entre giardíase e distribuição populacional por grupo sanguíneo (Sistema ABO).

Agradecimentos

Ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes, pela colaboração e sugestões recebidas durante a redação deste trabalho.

RIALA6/661

TORRES, D.M.A.G.V.; OLIVEIRA, M.I.; FUZIHARA, T.O.; DIAS, R.M.D.S.; MANGINI, A.C.S.; ANTUNES, J.L.F. & CORRÊA, F.M. de A. - Correlation between giardiasis and blood group (ABO System) in the Municipality of São Caetano do Sul, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1): 69-73, 1989.

ABSTRACT: Blood and stool samples from 580 schoolchildren living in São Caetano do Sul, São Paulo State, Brazil, were examined to test the hypothetical correlation between the prevalence of giardiasis and populational distribution by blood group (ABO System). The stool examination showed that 102 (17.59%) students were infected by *Giardia lamblia*, 166 (28.62%) presented other enteroparasitosis and 312 (53.79%) did not present any parasitic infection. The distribution by blood group of the students with giardiasis did not vary significantly ($p < 0,05$) in relation to the same distribution of others populational groups selected as standard, by means of control: the complex whole of students included in this investigation and the population of São Paulo and Santo André cities. Such results differ from those established by others scientific communications, and show the necessity of new and more extensive populational inquiries that should definitely confirm or reject the hypothesis in question.

DESCRIPTORS: giardiasis, correlation with blood-groups (ABO System); blood groups (ABO System), correlation with giardiasis; giardiasis, São Caetano do Sul, São Paulo, Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTHES, G.L. & KAY, R. – Blood-groups in giardiasis. *Lancet*, **1**(8015): 808, 1977.
2. BARRETTO, O.C.O.P.; ENOKIHARA, M.Y.; MAZAR Jr, W.; ZIWIAN, Z.L.J. & FERREIRA, J.L.M.S. – Distribuição do Sistema ABO e Rh, destacando-se a pesquisa do antígeno D^u, em Santo André, SP. *Rev. Hosp. Clínic. Fac. Med. S. Paulo*, **38**(3):111-4, 1983.
3. CHIEFFI, P.P.; WALDMAN, E.A.; WALDMAN, C.C.S.; SAKATA, E.E.; GERBI, L.J.; ROCHA, A.B. & AGUIAR, P.R. – Aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. paul. Med.*, **99**:34-6, 1982.
4. FARIA, R. & OLLENSOOSER, F. – Grupos ABO e tipos de Rh em pretos e mulatos de São Paulo. *Arg. Biol.*, **35**(304):68-73, 1951.
5. FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; MILER, M.J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L.F.; TOBIE, J. & WALKER, J.H. – A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I - Preliminary communication. *Amer. J. trop. Med.*, **18**:169-83, 1938.
6. GLOBER, G.A.; CANTRELL, E.G.; DOLL, R. & PETO, R. – Interaction between ABO and Rhesus blood-group, the site of origin of gastric cancers, and the age and sex of the patient. *Gut*, **12**:570-3, 1971.
7. GUIMARÃES, R.C.; TONIN, V.L.; RUBIO, E.M. & MOTA, N.G.S. – Doença de Chagas: raça, sexo e antígenos eritrocitários do hospedeiro humano. *Ciênc. Cult.*, **29**(7):715-6, 1977.
8. HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A. & JANER, J.L. – The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J. publ. Health*, **9**: 281-98, 1934.
9. LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J. & CANÇADO, J.R. – *Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação*, 6^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, c1985. p.534-654.
10. McCONNELL, R.B. – Progress report: genetics and gastroenterology. *Gut*, **12**:592-8, 1971.
11. SALZANO, F.M. & FREIRE-MAIA, H. – Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. São Paulo, Nacional/EDUSP, 1967. p. 128-41.
12. SPIEGEL, M.R. – *Estatística*. São Paulo, Mc-Graw-Hill, 1978.
13. ZISMAN, M.; MELO, G.S.; MONTE, L.A. & KAUFFMAN, F. – Giardíase e grupos sanguíneos. *J. Pediatr.*, **44**(4):222-5, 1978.

Recebido para publicação em 9 de fevereiro de 1989.

PATOLOGIA DA LEPTOSPIROSE. ANÁLISE CRÍTICA DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS RELEVANTES PARA A COMPREENSÃO DA PATOGENIA

Venâncio Avancini Ferreira ALVES *
Sheila Aparecida Coelho SIQUEIRA *
Cynthia Bomfim PESTANA *

RIALA6/662

ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C. & PESTANA, C.B. – Patologia da leptospirose. Análise crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a compreensão da patogenia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1)75-80, 1989.

RESUMO: Essa revisão que se concentra nos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos da leptospirose humana e experimental analisa as principais possibilidades patogênicas. O fígado pode apresentar hepatite colestática com destrabeculação de hepatócitos nas fases de máxima gravidade. O acometimento renal varia desde nefrite intersticial até necrose tubular aguda. Miosites com predomínio de mononucleares são descritas em vários músculos, especialmente na panturrilha. Miocardites e coronarites são relacionadas aos casos de morte súbita. De fato, a vasculite pode ser considerada sistêmica e multifocal. Os pulmões podem ter focos pneumônicos e até extensas hemorragias alveolares e pleurais. A detecção de antígenos de leptospira em biópsias e autópsias permite o diagnóstico etiológico, favorecendo também hipóteses patogênicas que propõem que as principais lesões decorram de ação direta, sobre membranas de células parenquimatosas e endoteliais, inicialmente da leptospira íntegra e a seguir de produtos de sua degradação por macrófagos.

DESCRIPTORIOS: leptospirose, histopatologia, imuno-histoquímica, patogênese.

INTRODUÇÃO

A leptospirose compreende extenso grupo de infecções humanas e animais de caráter septicêmico causadas por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Na classificação atual²⁰ inclui-se na família *Leptospiraceae*, da ordem *Spirochetales*. YASUDA et alii²⁵ reconhecem a existência de três espécies: *L. interrogans*, *L. biflexa* e *L. parva*. SCHMID et alii²⁷ adicionam uma quarta, *L. inadai*. Na *L. interrogans*, em que se situam as leptospiros patogênicas, já são conhecidos mais de 170 sorotipos, organizados em 19 sorogrupos²⁰. Recentemente, YASUDA et alii²⁵ através de estudos de hibridização molecular de DNA propuseram nova classificação com 7 espécies neste gênero.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição universal. Os roedores são os principais vetores, como destaca ENRIETTI¹⁶, que obteve 78% de positividade em ratos capturados no centro de Curitiba. Em países desenvolvidos, esta entidade é citada como risco ocupacional acometendo principalmente trabalhadores de serviços de água e esgoto, mineiros e agricultores. Em nosso meio, entretanto, a água contaminada, particularmente em inundações, é o principal veículo de infecção humana^{7,9}. Somente no Estado do Rio de Janeiro, 1.062 casos foram relatados após as inundações do verão de 1988, com 52 óbitos relatados à Secretaria Estadual de Saúde.

A presente revisão concentra-se nos aspectos morfológicos da leptospirose humana e experi-

* Da Divisão de Patologia do Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

mental, vistos à microscopia óptica comum e eletrônica, bem como na distribuição de antígenos nos tecidos, através de métodos imuno-histoquímicos. A integração entre os achados visa a análise dos aspectos patogênicos mais relevantes.

Entre as primeiras descrições anatomopatológicas da leptospirose humana estão as de BEITZKE⁸ e PICK²⁵, até hoje aceitas e que caracterizam o fígado e o rim como órgãos de intenso acometimento. À macroscopia verifica-se hepatomegalia com intensa congestão e graus variáveis de colestase caracterizada por tonalidade esverdeada do parênquima hepático^{4,10,18}.

À microscopia óptica, BEITZKE⁸ e PICK²⁵ já notaram preservação da arquitetura lobular, sendo as lesões mais acentuadas nas regiões centrilobulares, observando-se pleomorfismo de hepatócitos, ora tumefeitos, balonizados e abarrotados de pigmento biliar, ora com degeneração acidofílica. Outros hepatócitos apresentam significativa atividade regenerativa. O encontro de hepatócitos em mitose é dado marcante e de importância diagnóstica na leptospirose, sendo raro em outras hepatopatias^{4,11}. A destrabeculação, com perda da coesão entre as células dando origem aos "hepatócitos perdidos", é relatada com destaque nos estudos de necrópsias. Em material obtido de biópsias, alguns autores registram este achado^{10,2}, enquanto outros não o confirmam considerando estes que tal alteração ocorreria em períodos agônicos da doença.

Em recente trabalho experimental¹, tal lesão foi demonstrada como genuína, porém vista na fase terminal da infecção resultando da progressiva tumefação ou necrose acidofílica dos hepatócitos, decorrentes de ação tóxica direta da leptospira e de seus produtos de degradação sobre as membranas celulares.

O pigmento biliar é encontrado tanto no citoplasma de hepatócitos como no das células de Kupffer, sendo também demonstrados cilindros pigmentares nos canalículos biliares^{4,11,21}. As células de Kupffer mostram-se hipertróficas e em maior número, por vezes formando agrupamentos na luz dos sinusóides⁸. Nos espaços-porta os principais achados são edema e infiltrado inflamatório variando de discreto a moderado, com predomínio de linfócitos, macrófagos e raros polimorfonucleares eosinófilos. A placa limitante mantém-se preservada. A esteatose é observada em raros casos.

À microscopia eletrônica, DE BRITO et alii¹¹ encontraram distorções no polo sinusoidal de

alguns hepatócitos, muitas vezes acompanhadas do desaparecimento de microvilosidades, imputando estes achados à ação de eventuais toxinas circulantes. Detectaram ainda distorção ou desaparecimento de microvilosidades de capilares biliares, alteração esta inespecífica, que também é detectada em formas intra e extra-hepáticas de colestase¹⁵. Os principais estudos, visando detecção de leptospirose em tecido^{4,13,14}, empregaram impregnação argêntica adaptada a cortes de parafina, segundo a técnica de Whartin e Starry, com encontro de espiroquetas em 25 a 30% dos casos¹⁶. O método de Levaditi é menos utilizado por se basear na impregnação de sais de prata em tecido não incluído.

Recentemente, a aplicação de técnica imuno-histoquímica⁹ a cortes de tecido hepático humano obtidos de necrópsias e biópsias permitiu a identificação de antígenos de leptospira, que assumem aspecto alongado ou granular, em todos os 15 casos testados. O antígeno foi detectado no interstício edemaciado na periferia dos espaços-porta, no lúmen de sinusóides e de ramos venosos portais, e também fagocitado no citoplasma de células de Kupffer e de macrófagos portais². A demonstração do antígeno foi predominante, nas células de Kupffer, nos casos de biópsias que espelham fase de regressão anatomopatológica da doença².

Experimentalmente, após uma fase inicial, septicêmica, as leptospirose visualizadas como antígeno filiforme atravessam a parede dos vasos, atingindo o interstício hepático¹. A partir daí, são fagocitadas pelos macrófagos ou acolam-se às membranas de hepatócitos. Nas fases mais avançadas da infecção, tornam-se proeminentes as formas granulosas de antígeno de leptospira, provavelmente expressando degradação parcial das espiroquetas pelos macrófagos.

Os rins, à macroscopia, mostram-se aumentados, amolecidos, pálidos e com estrias esverdeadas por impregnação biliar. São freqüentes os focos de hemorragia, muitas vezes subcapsulares.

À microscopia, chama a atenção o acometimento multifocal, encontrando-se néfrons destruídos ao lado de outros íntegros. O quadro varia de nefrite intersticial inespecífica até franca necrose tubular aguda, nos casos que cursam com insuficiência renal.

Os glomérulos estão em geral preservados¹⁶, havendo alguns relatos de alterações leves e focais¹³, incluindo hiperplasia de células mesangiais e tumefação endotelial. SITPRIJA et alii²⁰ apresentam raros casos com glomerulite bem instalada,

com proliferação de células mesangiais e endoteliais e permeação por polimorfonucleares.

No interstício edemaciado encontram-se agrupamentos de macrófagos, linfócitos e plasmócitos e poucos polimorfonucleares eosinófilos, notando-se em alguns campos concentração periglomerular e perivascular^{9,13}. As hemorragias podem ser minúsculas e focais nos casos leves, tornando-se volumosas nos casos de Síndrome de Weil.

As principais evidências de lesão renal concentram-se nos túbulos contornados, com acometimento difuso nos néfrons, ressaltando alguns autores o predomínio de distúrbios morfofuncionais nos túbulos proximais⁸. São descritos todos os estádios de degeneração, incluindo tumefação epitelial, dilatação tubular com aplainamento das células e até verdadeira necrose tubular aguda, com cariólise e coagulação hialina do citoplasma. Células epiteliais necróticas são eliminadas para o lúmen tubular, formando cilindros em conjunto com proteínas coaguladas. Também são frequentes os cilindros biliares e mesmo os formados por hemoglobina ou mioglobina. Além da degeneração celular, são sempre encontradas alterações atribuíveis à regeneração, caracterizadas por fileiras de células epiteliais cúbicas baixas com citoplasma mais basófilo com mitoses presentes. Vários autores salientam a dificuldade de se confirmar, através de métodos como o de Warthin-Starry, a presença de leptospiros no interstício e nos túbulos renais. PENA et alii²⁴ relatam positividade em 4 dentre 13 pacientes submetidos a biópsia renal, enquanto AREANY apresenta 65% de positividade no interstício renal em necrópsias humanas.

Estudos histoquímicos¹⁹ comprovam, em células tubulares lesadas, redução significativa da atividade enzimática da desidrogenase succínica e fosfatases ácida e alcalina. À microscopia eletrônica^{19,14}, foram observados aumento do número de citosomas e citossegregosomas nas células alteradas e lesões da borda em escova com redução e distorção das microvilosidades. O desaparecimento da coloração da borda em escova pelo PAS, verificado à microscopia óptica comum, da fosfatase alcalina à histoquímica enzimática e a redução e distorção das microvilosidades à microscopia eletrônica seriam um mesmo fenômeno detectado em abordagens diferentes, atestando lesão de membrana das células dos túbulos proximais. As alterações mitocondriais são muito significativas, compreendendo retração, tumefação e até o aparecimento de mitocôndrias gigantes com redução da densidade da matriz ou disposição anômala de suas cristas. Pode haver redução dos grânulos de ribonucleoproteína no citoplasma, com significativa dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso. O complexo de Golgi,

geralmente preservado, em algumas células apresenta vesículas irregularmente dilatadas. As lesões glomerulares a nível ultra-estrutural confirmam os achados da microscopia óptica, podendo ainda ser encontrada fusão local de podócitos e espessamento irregular, edematoso, da membrana basal glomerular^{13,14,22,29}.

À imunofluorescência, LAI et alii²² encontram, em 1 dentre 4 pacientes biópsiados, deposição de frações C_{1q} e C₃ do complemento em região mesangial de glomérulos e em arteríolas. Em experimentos com cobaias, YASUDA et alii³ também registraram encontro de depósitos de complemento, detectando ainda grandes acúmulos de antígeno de leptospira no interstício e nos túbulos.

À imunohistoquímica com amplificação pelo método da peroxidase - antiperoxidase encontram-se antígeno de leptospira em tecido renal em 5 dentre 8 autópsias de casos humanos². Predominaram os depósitos no interstício, no endotélio de vasos dilatados e no epitélio dos túbulos contornados, sendo também detectados no citoplasma de alguns macrófagos. A pesquisa nos glomérulos resultou negativa.

Infecções experimentais estudadas sequencialmente à microscopia eletrônica²³, à imunofluorescência³⁰, e à imunohistoquímica³ demonstram que as leptospiros, inicialmente encontradas na luz de capilares, permeando suas paredes, atingem o interstício, em direta relação com o surgimento de edema e de infiltrado inflamatório. Mais tardiamente, fragmentos de leptospira são encontrados na parede e luz dos túbulos, coincidindo com as alterações de suas células epiteliais. Estudos de outras localizações mostram que a lesão mais característica é da musculatura da panturrilha, sendo também destacados os acometimentos de músculos peitorais, dorsais e deltóides²⁶. Há dissociação das fibras musculares, com vacuolização, tumefação, perda da estriação e hialinização das células musculares, permeadas por macrófagos, alguns polimorfonucleares e plasmócitos. A rotura de fibras pode dar origem à deposição de material hialino no interstício¹⁹. O encontro de leptospira em tais lesões é tido como muito raro⁶. Entretanto, estudos à imunofluorescência revelam ocasionais depósitos antigênicos junto às fibras lesadas²⁸. UIP³¹ encontrou positividade imuno-histoquímica para antígeno de leptospira em 34 dentre 36 biópsias de panturrilha em pacientes oriundos do Estado de São Paulo.

Os pulmões podem se mostrar normais ou com múltiplos focos de hemorragia, também encontrados na pleura.

Analisando 2 casos necropsiados, ASHE et alii⁶ destacaram a existência de numerosos focos de hemorragia, notando pronunciado edema e exsudação de fibrina em muitos alvéolos. Nos focos de hemorragia foram encontrados agrupamentos de polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos e macrófagos, compondo em ambos os casos, quadro de pneumonia hemorrágica multifocal, em fase inicial, sendo o aporte dos leucócitos provavelmente secundário ao extravazamento de hemácias. A pesquisa de leptospirosas pelo método de Levaditi resultou negativa⁶. Achados similares foram obtidos por AREAN⁴ em 33 necrópsias de casos humanos fatais. Neste estudo, foram ainda encontrados quatro casos com padrão histológico característico de broncopneumonia e outros quatro com lesões sugestivas de infarto hemorrágico.

Dentre as alterações cardíacas, relata-se principalmente a lesão de fibras miocárdicas semelhante à descrita em musculatura esquelética. Também são relatadas miocardites, vistas segundo AREAN⁴, em 60% dos casos de leptospiroses. DRÄGERT¹⁷ descreveu dois casos de endocardite vegetante com demonstração de leptospira na lesão. Recentemente DE BRITO et alii¹² descreveram lesão coronariana focal com depósitos locais de antígeno de *L. interrogans* identificados à imuno-histoquímica. Estas lesões, descritas como arterite coronariana aguda, foram encontradas em 70% dos casos de necrópsias de pacientes com leptospirose, observando-se nesta mesma população aortite em 57,8% daqueles.

Em correspondência aos quadros clínicos neurológicos, a meningite leptospirótica é tida como freqüente, mas com grau discreto, com pequenos agregados de macrófagos e linfócitos nos espaços e ao redor de pequenos vasos. Por vezes, tais fenômenos se acompanham de edema cerebral^{6,21}.

Nos demais órgãos, as lesões são menos significativas, geralmente decorrentes de micro-hemorragias associadas à capilarite, que é sistêmica e multifocal.

As hipóteses mais atuais para a patogênese das lesões sistêmicas na leptospirose propõem que as lesões dos órgãos mais intensamente acometidos decorram da ação direta, sobre membranas das células parenquimatosas, inicialmente da leptospira íntegra e a seguir também de produtos granulados de sua degradação por macrófagos, incluindo a glicolipoproteína descrita por VINH et alii^{22,23}. Num primeiro momento, tal ação levaria a distúrbios funcionais dessas membranas, só acarretando necrose em fases tardias. A lesão dos vasos decorreria do mesmo processo ocorrendo nas células endoteliais. Tal dano vascular seria responsável direto pela diátese hemorrágica e indiretamente, através da hipóxia, pelo agravamento das lesões parenquimatosas dos órgãos acometidos.

RIALA6/662

ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C. & PESTANA, C.B. – Pathology of leptospirosis. A critical analysis of morphological and immunohistochemical features relevant to pathogenesis of systemic lesion. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):75-80, 1989.

ABSTRACT: Focus on morphology and immunohistochemistry of human and experimental leptospirosis, including a discussion on pathogenesis of major systemic injuries is revised. Liver involvement results in cholestatic hepatitis with cell-plate disarray in severe stages. Renal picture varies from interstitial nephritis up to acute tubular necrosis. Mononuclear myosites are seen in several muscles, notably in calves. Myocarditis and coronaritis are also described, perhaps related to sudden death. Indeed, leptospiral vasculitis can be considered a systemic and multifocal phenomenon. The lungs may show pneumonic foci or extense haemorrhage. Leptospiral antigen detection in biopsies and autopsies lead to the aetiological diagnosis, favoring also pathogenetic possibilities of a direct effect, first of intact leptospires and afterwards of their degrading substances, on membranes of parenchymal and endothelial cells.

DESCRIPTORS: leptospirosis, histopathology, immunohistochemistry, pathogenesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, V.A.F. – *Leptospirose experimental em coiba: Contribuição de dados morfológicos e imuno-histoquímicos para a compreensão de sua patogênica*. São Paulo, 1988. [Tese - Faculdade de Medicina, USP.
2. ALVES, V.A.F.; VIANNA, M.R.; YASUDA, P.H.; & DE BRITO, T. – Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J.Pathol.*, 151:125-31, 1987.
3. ALVES, V.A.F.; YASUDA, P.H.; YAMA SHIRO, E.H.; SANTOS, R.T.M.; YAMAMOTO, L.U. & DE BRITO, T. – An immunohistochemic assay to localize leptospire in tissue specimens. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 28(3): 170-3, 1986.
4. AREAN, V. – The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Amer. J. Pathol.*, 40:393-423, 1962.
5. ARRIAGA, A.J.D.; ROCHA, A.S.; YASUDA, P. & DE BRITO, T. – Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. ictero-haemorrhagiae*). *J. Pathol.*, 138:145-61, 1982.
6. ASHE, W.M.F.; PRATT-THOMAS, H.P. & KUMPE, C.S. – Weil's disease - A complete review of American literature and an abstract of the world literature. Seven case reports. *Medicine*, Baltimore, 20: 145-210, 1941.
7. AZEVEDO, R. & CORREA, M.O.A. – Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife em 1966: aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 85-111, 1968.
8. BEITZKE, H. – Veber die pathologische anatomie der ansteckenden gelbsucht (weil'sche krankheit). *Berl. klin. Wochenschr.*, 53: 188-91, 1916.
9. CAMARGO, M.C.C.; FIGUEIREDO, G.M.; VENEZIANI, P. & OKI, S. – Leptospirose. *Rev. paul. Med.*, 101(2): 74-6, 1983.
10. CORREA LIMA, M.B.C. – *Contribuição ao estudo do fígado na leptospirose*. Rio de Janeiro, 1971. [Tese-Escola de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro].
11. DE BRITO, T.; MACHADO, M.M.; MONTANS, S.D.; HOSHINO, S. & FREYMULLER, E. – Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 342 61-9, 1967.
12. DE BRITO, T.; MORAIS, C.F.; YASUDA, P.H.; LANCELLOTTI, C.P.; SHIMIZU, S.; YANASHIRO, E. & ALVES, V.A.F. – Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 81: 207-14, 1987.
13. DE BRITO, T.; PENNA, D.O.; PEREIRA, V.G. & HOSHINO, S. – Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 343: 124-35, 1967.
14. DE BRITO, T.; PENNA, D.; SANTOS, H.; FREYMULLER, E.; ALMEIDA, S.S.; GALVÃO, P.A.A. & PEREIRA, V. – Electron microscopy of human leptospirosis (kidney biopsies). *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 14(3): 397-403, 1965.
15. DESMET, V.J. – Morphologic and histochemical aspects of cholestasis. *Prog. Liver Dis.*, 4: 97-132, 1972.
16. DOOLEY, J.R. & ISHAK, K.G. – Leptospirosis. In: BINFORD, C.H. & CONNOR, D.H. – *Pathology of tropical and extraordinary disease*. Washington, D.C., 1976. p. 101-6.
17. DRÄGERT, E. – Beitrag zur pathologischen anatomie der weilscher Erkrankung. *Virchow's Arch. Pathol. Anat. Phys.*, 292: 452-64, 1934.
18. ENRIETT, M.A. – *Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospiras em murideos, caninos e suínos, no Paraná*. Curitiba, 1949. [Tese - Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Paraná].
19. JEGHER, H.R.; HOUGHTON, J.D. & FOLEY, J.A. – Weil's disease: report of a case and review of recent literature. *Arch. Pathol.*, 20: 447-76, 1935.
20. JOHNSON, R.C. & FAINE, S. – Genus I. Leptospiranoguchi 1917 755 Al. In: - BERGEY's manual of systematic bacteriology, edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984. p. 62-7.
21. KOPPISCH, E. & BOND, W.M. – The morbid anatomy of human leptospirosis: a report of thirteen fatal cases. In: SYMPOSIUM ON LEPTOSPIROSIS, 1952. Washington, Government Printing Office, 1953. p. 83-105. (Medical Science Publ. n° 1).
22. LAI, K.K.; AARONS, I.; WOODROFFE, A.J. & CLARKSON, A.R. – Renal lesions in leptospirosis. *Aust. N.Z. J. Med.*, 12: 276-9, 1982.
23. MARSHALL, R.B. – The route of entry of leptospire into the kidney tubule. *J. med. Microbiol.*, 9: 149-52, 1976.
24. PENNA, D.; DE BRITO, T.; PUPO, A.A.; MACHADO, M.M.; GALVÃO, P. A.A. & ALMEIDA, S.S. – kidney biopsy in human leptospirosis. *Amer. J. trop. Med.*, 12:896-901, 1963.
25. PICK, L. – Zur pathologischen anatomie des infektiösen icterus. *Berl. klin. Wochenschr.*, 19: 451-5, 1917.
26. SAN JUAN, F.; DUARTE, F.; TREIGER, M. & GONÇALVES, A.J.R. – Aspectos histológicos e funcionais do fígado na leptospirose ictero-hemorrágica. *Hospital*, 74(4): 95-118, 1968.

27. SCHMID, G.P.; STEERE, A.C.; KORNBLATT, KAUFMANN, A.F.; MOSS, C. S.; JOHNSON, R.C.; HOVIND-HOUGEN, K. & BRENNER, D.J. – Newly recognized *Leptospira* species (“*Leptospira inadai*” serovar lyme) isolated from human skin. *J. clin. microbiol.*, **24**(3): 484-6, 1986.
28. SHELDON, W.H. – Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technic in human muscle lesions of leptospirosis icterohemorrhagiae. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **84**: 165-7, 1953.
29. SITPRIJA, V. & EVANS, H. – The kidney in human leptospirosis. *Am. J. Med.*, **49**: 780-8, 1970.
30. SITPRIJA, V.; PIPATANAGUL, V.; MERTORID-JOJO, R.; BOONPUCKNAVIG V. & BOONPUCKNAVIG, S. – Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. *Kidney int.*, **17**: 827-36, 1980.
31. UIP, D. – *Diagnóstico precoce da leptospirose por biópsia do músculo da panturrilha*. São Paulo, 1989. [Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina, USP].
32. VINH, T.; ADLER, B. & FAINE, S. – Glycolipoproteins cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. gen. Microbiol.*, **132**: 111-123, 1986.
33. VINH, T.; ADLER, E. & FAINE, S. – Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. gen. Microbiol.*, **132**: 103-9, 1986.
34. YASUDA, P.H.; SHIMIZU, S.H.; YAMASHIRO, E.H. & DE BRITO, T. – Experimental leptospirosis (*L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*) of the guinea pig: leptospiral antigen, gamma globulin and complement c3 detection in the kidney. *Exp. Pathol.*, **29**: 35-43, 1986.
35. YASUDA, P.H.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F. & BRENNER, D.J. – Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. system. Bacteriol.*, **37**(4): 407-15, 1987.

Recebido para publicação em 13 de fevereiro de 1989.

HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS EM SÃO PAULO: ASPECTOS DA CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO, CÁDMIO E ZINCO *

Alice Momoyo SAKUMA **
Maria Anita SCORSAFAVA **
Odair ZENEBON **
Paulo TIGLEA **
Cláudio Junji FUKUMOTO **

RIALA6/663

SAKUMA, A.M.; SCORSAFAVA, M.A.; ZENEBON, O.; TIGLEA, P. & FUKUMOTO, C.J.
- Hortaliças comercializadas em São Paulo: aspectos da contaminação por chumbo, cádmio e zinco. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):81-84, 1989.

RESUMO: Foram determinados os níveis de contaminação de chumbo, cádmio e zinco em 294 amostras de seis diferentes tipos de hortaliças, comercializadas na cidade de São Paulo, provenientes de algumas regiões deste Estado. A análise, efetuada pelo método da espectrofotometria de absorção atômica com chama, revelou valores baixos para os três metais, demonstrando, neste estudo preliminar, que as hortaliças não representam riscos para o consumidor.

DESCRIPTORIOS: hortaliças, traços de metais em, determinação; cádmio, chumbo, zinco em hortaliças, determinação; espectrofotometria de absorção atômica.

INTRODUÇÃO

As hortaliças, além de serem importantes fontes de vitaminas e sais minerais para o homem, pelo alto teor de celulose são necessárias para o adequado funcionamento do trato gastrintestinal¹. Em contrapartida, poderão afetar a saúde do consumidor, por serem susceptíveis à contaminação em consequência da poluição ambiental (ar, água e solo), da constituição geoquímica e da utilização de fertilizantes.

Os metais pesados, tais como, chumbo e cádmio, quando introduzidos na cadeia alimentar, e ingeridos, poderão ocasionar toxicidade crônica ao homem, devido a um acúmulo progressivo dentro de seu organismo.

O alimento é a principal fonte de ingestão de chumbo pelos animais e pelo homem. Além de outras formas de contaminação, resíduos desse metal poderão surgir nos alimentos em decorrência

da sua absorção biológica nos solos, pelas plantas que irão ser consumidas pelos animais de abate ou diretamente pelo homem^{2,3} ou, ainda, pela contaminação de frutos e legumes cultivados em zonas expostas à descarga de fundição do metal, bem como pela exaustão de automóveis movidos a gasolina (o composto tetraquilchumbo é usado como aditivo antidetonante nesse combustível)³.

Algumas espécies de vegetais e cereais concentram cádmio quando cultivadas em solos poluídos por este metal; rochas fosfatadas podem conter teores elevados de cádmio, cujo fertilizante obtido desta fonte poderá estar contaminado. A doença itai-itai, que ocorreu em Toyama, no Japão, em 1952, foi ocasionada por ingestão de arroz contaminado por cádmio. A origem dessa contaminação foi devida à irrigação de plantações de arroz com água contaminada do rio Jintsu, proveniente de uma usina de cádmio-zinco-chumbo¹.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

O zinco, metal ubíquo no ambiente, a níveis baixos é essencial ao ser vivo, mas a ingestão de teores elevados poderá provocar toxicidade aguda.

Por se tratar de importante problema de saúde pública e com o intuito de preservar o bem-estar da coletividade, tornou-se imperativa a necessidade de conhecer os níveis de chumbo, cádmio e zinco nas hortaliças comercializadas na região de São Paulo. Foi efetuado levantamento de dados referentes àqueles contaminantes metálicos, em alguns tipos de hortaliças provenientes do principal centro distribuidor hortifrutigranjeiro do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODO

Foram determinados os teores de chumbo, cádmio e zinco em 294 amostras de seis diferentes tipos de hortaliças, provenientes de várias regiões do Estado de São Paulo, distribuídas pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), em um período de 27 meses. O método utilizado foi o da espectrofotometria de absorção atômica com chama. As regiões foram agrupadas de acordo com a localização geográfica em relação à cidade de São Paulo (tabela 1).

TABELA 1

Classificação das regiões de acordo com a localização geográfica em relação à cidade de São Paulo

Região	Municípios
A	Guarulhos, Suzano, Itaquaquecetuba, Arujá
B	Cotia, Embu, Embu-Guaçu, Ibiúna, Mairinque, Itapeverica da Serra, Caucaia do Alto, Vargem Grande, Taboão da Serra
C	Atibaia, Bragança Paulista
D	Mogi das Cruzes, Biritiba-Mirim, Taçupeba, Salesópolis, Jacareí, Santa Isabel, Jundiapéba
E	Município de São Paulo
F	Campinas, Jundiá, Campo Limpo Paulista, Paulínia

Aparelhagem

Espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, mod. 460); lâmpadas EDL de chumbo, cádmio e zinco; corretor de *background*; queimador de 10 cm para chama de ar/acetileno e impressora de resultados.

Reagentes

- Cádmio metálico (99,9% de pureza)
- Nitrato de chumbo, p.a.
- Zinco metálico (99,9% de pureza)
- Ácido clorídrico (com baixo teor de metais pesados)
- Ácido nítrico (com baixo teor de metais pesados)
- Ácido sulfúrico (com baixo teor de metais pesados)
- Mistura ácido-oxidante — Adicionar ácido nítrico concentrado em solução de ácido sulfúrico a 50%, na proporção de 4:1.

Solução-padrão de cádmio

Solução estoque, 1.000 mg/l — Dissolver 1,000 g de cádmio metálico em volume mínimo de solução de ácido clorídrico a 50% em balão volumétrico de 1 litro. Diluir até esse volume com solução de ácido clorídrico a 1%.

Solução-padrão de chumbo

Solução estoque, 1.000 mg/l — Dissolver 1,598 g de nitrato de chumbo em solução de ácido nítrico a 1% em balão volumétrico de 1 litro. Diluir até esse volume com solução de ácido clorídrico a 1%.

Solução-padrão de zinco

Solução estoque, 500 mg/l — Dissolver 0,500 g de zinco metálico em volume mínimo de solução de ácido clorídrico a 50% em balão volumétrico de 1 litro. Diluir até esse volume com solução de ácido clorídrico a 1%.

Procedimento

Pesar exatamente cerca de 40 g da amostra, previamente homogeneizada em liquidificador, em cápsula de porcelana. Secar em estufa a 80°C, adicionar 2,5 ml da mistura ácido-oxidante⁶ e deixar em chapa elétrica até carbonização. Colocar em mufla a 450°C, para obter cinzas isentas de carvão. Dissolver o resíduo em ácido clorídrico concentrado e evaporar. Transferir quantitativamente com água destilada e desmineralizada para balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com o mesmo solvente.

TABELA 2

Níveis de cádmio, chumbo e zinco em mg/kg de 294 amostras de seis espécies de hortaliças comercializadas em São Paulo

Região	Hortaliças	Nº amostras	Cádmio		Chumbo		Zinco	
			m	np	m	np	m	np
A	alface	11	0,05	0,07	0,34	0,44	6,06	13,10
	almeirão	11	0,05	0,12	0,41	0,61	6,28	12,29
	escarola	10	0,05	0,08	0,25	0,38	4,82	5,05
	catalonha (*)	8	0,05	0,10	0,28	0,46	5,83	7,18
	agrião	7	0,04	0,06	0,25	0,28	7,73	8,18
B	alface	20	0,03	0,06	0,22	0,47	2,25	6,06
	almeirão	16	0,04	0,08	0,25	0,50	5,02	10,35
	escarola	24	0,04	0,08	0,17	0,42	2,98	6,88
	catalonha	12	0,05	0,06	0,22	0,54	4,04	8,17
	rúcula	5	0,05	0,06	0,21	0,42	3,59	4,60
C	alface	15	0,04	0,05	0,28	0,57	3,42	4,76
D	alface	71	0,03	0,07	0,27	0,48	4,01	8,97
	almeirão	5	0,02	0,05	0,37	0,49	5,05	5,58
	escarola	30	0,04	0,05	0,22	0,36	3,00	10,41
	agrião	17	0,04	0,06	0,21	0,32	4,69	10,11
	rúcula	3	0,05	0,05	0,36	0,36	8,62	8,62
E	alface	6	0,05	0,06	0,35	0,53	3,02	4,60
	almeirão	3	0,10	0,10	0,45	0,45	10,31	10,31
F	alface	20	0,02	0,05	0,19	0,27	2,80	4,96

m = mediana.

np = nonagésimo percentil.

(*) = catalonha (ital. *catalognia*)

Fazer um branco, transferindo 2,5 ml da mistura ácida-oxidante para uma cápsula de porcelana e evaporar em chapa elétrica. Esfriar, adicionar ácido clorídrico concentrado em quantidade idêntica à utilizada no tratamento da amostra e evaporar em chapa elétrica. Dissolver o resíduo em 25 ml de água destilada e desmineralizada.

As leituras, no aparelho, das amostras e do branco devem ser efetuadas nas condições descritas, usando os padrões adequados, preparados a partir das soluções-estoques de cada um dos metais.

RESULTADOS

As amostras de hortaliças analisadas foram classificadas segundo a região de origem e de acordo com as espécies vegetais. Os resultados dos teores de cádmio, chumbo e zinco obtidos em todas as amostras estão expressos na tabela 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos, observa-se que a contaminação pelos metais pesados analisados não é

influenciada pelo período em que a hortaliça é colhida, mas pela proximidade dos grandes centros industriais em que é cultivada, como o que ocorreu com as amostras do município de São Paulo e Guarulhos.

Os níveis de chumbo encontrados nas hortaliças analisadas, quando comparados com aqueles apresentados por ISASA et alii⁴ (valores médios de 0,19 a 3,24 mg/kg, para pimentões e couve-manteiga), são baixos, demonstrando através deste estudo preliminar que a situação de nossas hortaliças é satisfatória quanto aos contaminantes analisados. A legislação brasileira⁷ estabelece limites para chumbo, cádmio e zinco somente para hortaliças em conservas, fixando respectivamente, para cada um dos metais, os valores de 0,50, 0,20 e 25,00 mg/kg.

Com relação aos baixos níveis de cádmio encontrados nas amostras analisadas, confirma-se que os fertilizantes fosfatados usados no Brasil contêm teores insignificantes desse metal pesado, diferente daqueles utilizados nos E.U.A., onde os teores de cádmio podem variar de 4 a 147 mg/kg⁸.

RIALA6/663

SAKUMA, A.M.; SCORSFAVA, M.A.; ZENEBO, O.; TIGLEA, P. & FUKUMOTO, C.J.
– Fresh vegetables sold in São Paulo: aspects of lead, cadmium and zinc contamination.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, **49**(1): 81-84, 1989.

ABSTRACT: 294 samples of different kinds of fresh vegetables sold in São Paulo City, Brazil, were analysed for their lead, cadmium and zinc contents by flame atomic absorption spectrophotometry. The levels for these contaminants showed that the vegetables do not represent risk to health consumer.

DESCRIPTOR: vegetables, trace-elements in, determination; cadmium, lead, zinc in vegetables, determination; flame atomic spectrophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COMMISSION ON THE EUROPEAN COMMUNITIES – *Criteria (dose/effect relationships) for cadmium*. Oxford, Pergamon Press, 1978. p. 15-120.
2. CREWS, H.M. & DAVIES, B.E. – Heavy metal uptake from contaminated soils by six varieties of lettuce. *J. Agric. Sci.*, **105**(3): 591-5, 1985 apud *Food Sci. Technol. Abstr.*, **18**(3):115, 1986.(3j193).
3. FOWLES, G.W.A. – Lead content of roadside fruit and berries. *Food Chem.*, **1**: 33-9, 1976.
4. ISASA, M.E.T. & RICÓN, M.C.M. – Plomo y cadmio como contaminantes de hortaliças en fresco. *Anal. Bromatol.*, **34** (10): 71-80, 1982.
5. LANGENBACH, T. & SCARPA, M. – Teor de cádmio nos fertilizantes fosfatados brasileiros. *Rev. bras. Cienc. Solo*, **9**: 179-81, 1985.
6. PREER, J.R.; STEPHENS, B.R. & BLAND, C.W. – Sample preparation in determination of lead in garden vegetables by flame atomic absorption spectrophotometry. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, **65** (4): 1010-5, 1982.
7. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 15-6. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas (NTA 31).
8. THORNTON, I. & JONES, T.H. - Sources of lead and associated metal in vegetables grow in British urban soil: uptake from the soil versus air deposition. *Trace Subst. Environ. Health*, **18**: 303-10, 1984.

Recebido para publicação em 21 de fevereiro de 1989.

TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS PARA INVESTIGAÇÃO DE
ANIMAIS NATURALMENTE INFECTADOS POR FLAGELADOS
DO GÊNERO *TRYPANOSOMA* GRUBY, 1843*

José Eduardo TOLEZANO **
Elizabeth Visone NUNES **
Oswaldo Martinez D'ANDRADE **
Maria de Fátima Lerenó de ARAUJO **
José Mario de Freitas BALANCO **
Pedro Paulo CHIEFFI **
Sansão da Rocha WESTPHALEN **
Carmem do Socorro GUILHERME **
Anna Maria VALENTIM **
Luiz Eloy PEREIRA **

RIALA6/664

TOLEZANO, J.E.; NUNES, E.V.; D'ANDRADE, O.M.; ARAUJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F. CHIEFFI, P.P.; WESTPHALEN, S.R.; GUILHERME, C.S.; VALENTIM, A.M. & PEREIRA, L.E. – Técnicas parasitológicas para investigação de animais naturalmente infectados por flagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):85-92, 1989.

RESUMO: No presente trabalho, procurou-se avaliar comparativamente as técnicas do exame de sangue a fresco, do esfregaço sangüíneo, da hemocultura e do xenodiagnóstico como procedimentos laboratoriais para triagem de hospedeiros não humanos naturalmente infectados por flagelados do gênero *Trypanosoma*. De um total de 440 animais pertencentes a 22 espécies diferentes, 57 (12,95%) revelaram presença de tripanossomos na circulação. O xenodiagnóstico mostrou ser a técnica mais efetiva para demonstração de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* em *Didelphis marsupialis* e *Philander opossum*. Em *Nasua nasua*, *Trypanosoma* foi observado em todos os procedimentos investigados. As técnicas do exame de sangue a fresco e do esfregaço sangüíneo foram mais eficientes para *T. (Herpetosoma)* e *T. (Trypanozoon) evansi* entre *Proechimys iheringi* e *Canis familiaris*, respectivamente.

DESCRITORES: *Trypanosoma* em hospedeiros não humanos, diagnóstico, técnicas parasitológicas.

INTRODUÇÃO

Ainda hoje, não está totalmente esclarecido o papel desempenhado por hospedeiros não humanos na epidemiologia de doenças causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843, que podem infectar o homem ou os animais de interesse do homem. Diversos estudos têm

revelado que alguns destes flagelados são capazes de infectar uma grande diversidade de animais vertebrados pertencentes a diferentes espécies, diferentes gêneros, diferentes famílias e mesmo diferentes ordens, tais como os tripanossomos dos subgêneros *Schizotrypanum* Chagas, 1909 e *Trypanozoon* Lühe, 1906. Outros *Trypanosoma*, como os do subgênero *Herpetosoma* Doflein, 1901 revelam altíssimo grau de

* Realizado na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Parcialmente subvencionado pelo PIVE-VI-Proc. 400909/85-CNPq.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

especificidade no determinismo do hospedeiro vertebrado^{6,15,19,24,26}.

O encontro e o estudo de hospedeiros não humanos, naturalmente infectados por tripanossomos, revestem-se de grande importância em Saúde Pública, na medida em que permitem revelar reservatórios silvestres desses flagelados em natureza, ou ao menos indicar possíveis fontes de infecção para os hospedeiros invertebrados. Tal estudo pode permitir ainda a obtenção de modelos experimentais alternativos para uma melhor compreensão de aspectos envolvidos na relação parasita-hospedeiro, assim como, pode também fornecer subsídios para interpretação, ou mesmo especulação filogenética destes protozoários.

Em estudo anterior²⁵, foi analisada a eficácia do esfregaço sangüíneo como técnica de triagem capaz de revelar a presença de tripanossomos na circulação de quirópteros e marsupiais. No presente trabalho, tem-se por objetivo avaliar comparativamente as técnicas do exame de sangue a fresco, do esfregaço sangüíneo, da hemocultura e do xenodiagnóstico como procedimentos laboratoriais para triagem de hospedeiros não humanos naturalmente infectados por tripanossomos.

MATERIAL E MÉTODOS

No período compreendido entre 1982 e 1988, 440 animais foram examinados para verificação da presença de protozoários do gênero *Trypanosoma* (tabela 1). Destes, 36 eram cães do município de Olímpia no Estado de São Paulo, que tinham história de participação em atividades de caça no município de Camapuã no Estado de Mato Grosso do Sul²⁰, onde foram "muito incomodados" por tabanídeos. Retornaram ao município de Olímpia, onde adoeceram, com quadro de mal de cadeiras. Os demais eram animais silvestres-pertencentes às ordens Rodentia, Marsupialia, Carnivora, Edentata, Lagomorpha, Chiroptera e da classe Reptilia, capturados em cinco estações de serviço de campo no Estado de São Paulo, trabalhadas pela Seção de Parasitoses Sistêmicas, situadas nos municípios de São Paulo, Iguape, Itapetininga, Salesópolis e São Roque (tabela 1).

Em todos os animais examinados efetuaram-se os seguintes procedimentos:

a) *Exame de sangue a fresco* – entre lâmina e lamínula, com observações microscópicas a 100 e 400 aumentos;

b) *Exame de esfregaço sangüíneo* – fixado pelo metanol e corado pelo Giemsa, com observações microscópicas a 100, 400 e 1.000 aumentos;

c) *Hemoculturas* – realizadas pela semeadura de 0,1 a 0,2 ml de sangue em um ou dois tubos de meio NNN ou em meio de Ducrey, com observações microscópicas entre lâmina e lamínula, a 100 e 400 aumentos, efetuadas semanalmente até 45 dias após a semeadura. Em dois exemplares de *Proechimys iheringi*, foi testada semeadura de sangue em meio de Ducrey com adição de 2% de sangue deste roedor em sua composição;

d) *Xenodiagnósticos* – realizados com a utilização de ninfas entre 3º e 4º estádios de desenvolvimento de *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius neglectus*. O número de triatomíneos empregados, variou, de acordo com o porte do animal examinado, de 3 a 5 ninfas para *Akodon* sp. até 25 a 30 ninfas para *Didelphis marsupialis*. Foi permitido que os insetos se alimentassem até a saciedade, ou seja, até que eles se afastassem espontaneamente da fonte alimentar. O conteúdo intestinal dos "barbeiros" foi examinado aos 30 e 60 dias após a aplicação desses exames.

Dos cães, o sangue foi colhido da pata esquerda traseira para realização do exame a fresco, esfregaço sangüíneo e hemocultura, e, xenodiagnóstico foi aplicado na face ventral do abdômen. Os animais silvestres foram anestesiados com cloridrato de Ketamina, quando então se procedeu à aplicação do xenodiagnóstico e à punção cardíaca para realização dos exames do sangue, anteriormente citados.

RESULTADOS

De um total de 440 animais examinados, 57 (12,95%) mostraram-se positivos para alguma espécie de *Trypanosoma* (tabela 1).

A tabela 2, mostra os animais positivos para protozoários do gênero *Trypanosoma*, distribuídos segundo a espécie de animal examinado e o tipo de técnica laboratorial utilizada. Dentre os animais encontrados naturalmente infectados, em 16 *Proechimys iheringi* observou-se a presença de *Trypanosoma* do subgênero *Herpetosoma* tipo *lewisii*. Apesar de revelarem alta parasitemia no sangue, os xenodiagnósticos foram sempre negativos. O hemocultivo somente foi positivo nas duas ocasiões em que foram adicionados 2% de sangue deste roedor na formulação do meio de Ducrey. Dos marsupiais, 17 *Didelphis marsupialis* e 4 *Philander opossum* mostraram-se positivos para *Trypanosoma* do subgênero *Schizotrypanum* tipo *cruzi*^{2,3,4} todos revelados a partir de xenodiagnóstico. Entre *D. marsupialis* infectados, o exame de sangue a fresco, o esfregaço sangüíneo e a hemocultura foram positivos para este protozoário, uma, uma e três vezes, respectivamente. Dos carnívoros, o único exemplar de *Nasua*

TABELA 1

Animais examinados, segundo município e classificação, para triagem de hospedeiros de tripanossomatídeos no Estado de São Paulo

Municípios do Estado de São Paulo Animal examinado	São Paulo		São Roque		Iguape		Itapetininga		Salesópolis		Olimpia		Total
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	
CLASSE MAMMALIA													
ORDEM RODENTIA													
<i>Akodon arviculoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	4	(100,0)	-	-	4
<i>Akodon</i> sp.	64	(50,4)	20	(15,7)	37	(29,1)	-	-	6	(4,7)	-	-	127
<i>Callomys</i> sp.	2	(40,0)	-	-	-	-	3	(60,0)	-	-	-	-	5
<i>Clyomys laticeps</i>	-	-	-	-	-	-	7	(100,0)	-	-	-	-	7
<i>Delomys dorsalis</i>	-	-	-	-	3	(25,0)	-	-	9	(75,0)	-	-	12
<i>Nectomys squamipes</i>	-	-	-	-	15	(88,2)	-	-	2	(11,8)	-	-	17
<i>Proechimys ihering</i>	-	-	-	-	1	(5,3)	-	-	18	(94,7)	-	-	19
<i>Oryzomys capito</i>	-	-	-	-	1	(11,1)	-	-	8	(88,9)	-	-	9
<i>Oryzomys elurus</i>	-	-	-	-	2	(50,0)	2	(50,0)	-	-	-	-	4
<i>Oryzomys</i> sp.	5	(100,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Oxymycterus quaestor</i>	-	-	-	-	5	(100,0)	-	-	-	-	-	-	5
<i>Rattus rattus</i>	2	(100,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
ORDEM MARSUPIALIA													
<i>Didelphis marsupialis</i>	55	(44,0)	25	(20,0)	36	(28,8)	7	(5,6)	2	(1,6)	-	-	125
<i>Philander opossum</i>	-	-	-	-	16	(37,2)	1	(2,3)	26	(60,5)	-	-	43
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	(100,0)	-	-	2
<i>Marmosa</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	(100,0)	-	-	1
ORDEM CARNIVORA													
<i>Nasua nasua</i>	-	-	-	-	1	(100,0)	-	-	-	-	-	-	1
<i>Canis familiaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	(100,0)	36
ORDEM EDENTATA													
<i>Dasypus novemcinctus</i>	-	-	2	(50,0)	1	(25,0)	1	(25,0)	-	-	-	-	4
ORDEM LAGOMORPHA													
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	1	(100,0)	-	-	-	-	1
ORDEM CHIROPTERA													
<i>Carollia perspicillata</i>	-	-	-	-	6	(100,0)	-	-	-	-	-	-	6
CLASSE REPTILIA													
ORDEM SQUAMATA													
<i>Teguxim tupinambis</i>	-	-	2	(40,0)	3	(60,0)	-	-	-	-	-	-	5
Total	128	(29,1)	49	(11,1)	127	(28,9)	22	(5,0)	78	(17,7)	36	(8,2)	440

TOLEZANO, J.E.; NUNES, E.V.; DANRADE, O.M.; ARAUJO, M.F.; BALANCO, J.M.F.; CHIEFFI, P.P.; WESTPHALEN, S.R.; GUILHERME, C.S.; VALENTIM, A.M. & PEREIRA, L.E. - Técnicas parasitológicas para investigação de animais naturalmente infectados por flagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(1)85-92, 1989.

TABELA 2

Freqüência de flagelados do gênero *Trypanosoma*, encontrados em hospedeiros não humanos do Estado de São Paulo, examinados segundo técnicas parasitológicas

Hospedeiro infectado	Técnicas parasitológicas												Animais examinados		
	Exame a fresco			Esfregaço sangüíneo			Hemocultura			Xenodiagnóstico			Infectados	Não infectados	Total
	<i>T. (S.) cruzi</i>	<i>T. (Herpetosoma)</i>	<i>T. (T.) evansi</i>	<i>T. (S.) cruzi</i>	<i>T. (Herpetosoma)</i>	<i>T. (T.) evansi</i>	<i>T. (S.) cruzi</i>	<i>T. (Herpetosoma)</i>	<i>T. (T.) evansi</i>	<i>T. (S.) cruzi</i>	<i>T. (Herpetosoma)</i>	<i>T. (T.) evansi</i>			
CLASSE MAMMALIA															
ORDEM RODENTIA															
<i>Proechimys iheringi</i>	0	16	0	0	16	0	0	2*	0	0	0	0	16	3	19
ORDEM MARSUPIALIA															
<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0	1	0	0	3	0	0	17	0	0	17	108	125
<i>Philander opossum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	39	43
ORDEM CARNIVORA															
<i>Canis familiaris</i>	0	0	19	0	0	19	0	0	0	0	0	0	19	17	36
<i>Nasua nasua</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
Demais ordens e espécies	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	216	216
Total	2	16	19	2	16	19	4	2	0	22	0	0	57	383	440

* Exemplares cujas amostras de sangue foram semeadas em meio de Ducrey com a adição de 2% de sangue de *P. iheringi* em sua formulação.

TOLEZANO, J.E.; NUNES, E.V.; D'ANDRADE, O.M.; ARAUJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; CHIEFFI, P.P.; WESTPHALEN, S.R.; GUILHERME, C.S.; VALENTIM, A.M. & PEREIRA, L.E. — Técnicas parasitológicas para investigação de animais naturalmente infectados por flagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(1):85-92, 1989.

Frequência dos hospedeiros não humanos encontrados naturalmente infectados por tripanossomos, distribuídos segundo município de origem e classificação *

Hospedeiro	Município de origem	Iguape	Salesópolis	Itapetininga	Olimpia	Animais examinados		
						Infectados	Não infectados	Total
CLASSE MAMALIA								
ORDEM RODENTIA								
	<i>Proechimys iheringi</i>	0	16	0	0	16	3	19
ORDEM MARSUPIALIA								
	<i>Didelphis marsupialis</i>	15	0	2	0	17	108	125
	<i>Philander opossum</i>	4	0	0	0	4	39	43
ORDEM CARNIVORA								
	<i>Canis familiaris</i>	0	0	0	19	19	17	36
	<i>Nasua nasua</i>	1	0	0	0	1	0	1
	Demais ordens e espécies	0	0	0	0	0	216	216
Total		20	16	2	19	57	383	440

* Não foram encontrados animais infectados por tripanossomos nos municípios de São Paulo e São Roque.

TOLEZANO, J.E.; NUNES, E.V.; D'ANDRADE, O.M.; ARAUJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; CHEREFI, P.P.; WESTPHALEN, S.R.; GUILHERME, C.S.; VALENTIM, A.M. & PEREIRA, L.E. - Técnicas parasitológicas para investigação de animais naturalmente infectados por flagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(1):85-92, 1989.

nasua examinado foi positivo para *Trypanosoma* tipo *cruzi*, no exame de sangue a fresco, no esfregão sangüíneo, na hemocultura e no xenodiagnóstico. Dos 36 cães investigados, 19 mostraram-se positivos para *Trypanosoma* do subgênero *Trypanozoon* tipo *evansi*, nos exames de sangue a fresco e no esfregão sangüíneo. Ainda que mostrassem alta parasitemia, a hemocultura e o xenodiagnóstico foram sempre negativos (tabela 2).

Pela tabela 3, observa-se a distribuição dos hospedeiros não humanos, positivos para tripanossomos, segundo espécie de animal examinado e o seu município de origem.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os estudos realizados para avaliação da importância de hospedeiros não humanos como reservatórios naturais ou fontes de infecção para triatomíneos ou outros vetores biológicos ou mecânicos, na transmissão de tripanossomos para o homem ou para os animais de interesse do homem, sempre assumiram papel de destaque em Parasitologia Médica e Veterinária, ou mesmo em termos de Saúde Pública na Vigilância Epidemiológica das tripanossomíases.

No presente trabalho, foram observados 57 animais naturalmente infectados por tripanossomos pertencentes aos subgêneros *Schizotrypanum*, *Herpetosoma* e *Trypanozoon*. As tentativas de verificação da presença destes flagelados na circulação de animais, capturados nos municípios de São Paulo e São Roque, foram sempre negativas em qualquer uma das técnicas parasitológicas empregadas.

A freqüência de animais naturalmente infectados por alguma espécie de *Trypanosoma*, equivaliu a 12,95% (57/440) e pode ser considerada elevada, principalmente, se considerarmos que tal positividade concentrou-se em apenas 5 espécies de um total de 22 investigadas.

Trabalhos semelhantes, realizados em outras regiões do Brasil, mostraram freqüências de parasitismo para tripanossomos bastante próximas às do presente estudo^{8,9,16}.

Os resultados, observados na tabela 2, revelam que, enquanto entre os marsupiais a técnica do xenodiagnóstico mostrou todos os animais diagnosticados positivos para *Trypanosoma*, para os cães e os exemplares de *Proechimys iheringi* as técnicas do exame de sangue a fresco e a do esfregão sangüíneo foram as mais efetivas para a demonstração da circulação do flagelado no sangue destes animais. Para o único exemplar de coati (*N. nasua*) examinado, todas as quatro

técnicas demonstraram a presença do protozoário no sangue.

O achado de *Trypanosoma* do subgênero *Schizotrypanum* tipo *cruzi*, encontrado entre os marsupiais *Didelphis marsupialis* e *Philander opossum* e o coati *Nasua nasua*, não constitui relato novo, já que parece bastante freqüente serem encontrados naturalmente infectados por tal parasita. A freqüência de resultados negativos entre marsupiais, para as técnicas do exame de sangue a fresco e esfregão sangüíneo, confirmam resultados anteriormente observados^{7,9,11,17,25}, que mostraram serem estas técnicas pouco sensíveis para detecção de *T. cruzi* entre gambás. A ausência de parasitismo de roedores, por esta espécie de *Trypanosoma*, possibilita questionar, à semelhança de LAINSON et alii (1979)¹⁶, se o comportamento e os hábitos desses animais de menor porte impediriam ou dificultariam o contato com vetores ou eventuais fontes de infecção. Em estudo efetuado por FORATTINI et alii⁹, na região de Salto do Pirapora no Estado de São Paulo, de um total de 744 animais examinados, a grande maioria roedores, o xenodiagnóstico apenas foi positivo para dois exemplares, *Akodon arviculoides* e *Oryzomys nigripes*.

Diversos pesquisadores têm requisitado posição de destaque para mamíferos da ordem *Marsupialia*, família *Didelphidae* e, especialmente, para as espécies do gênero *Didelphis* como reservatórios primários de *T. cruzi*^{1,3,4,5,6,17,21,23}. Sua importância como elo de ligação entre os ciclos silvestres e peridomiciliares e domiciliares seria entendida pela freqüência com que visitam o domicílio e o peridomicílio humano¹⁰; além do que, já foi mostrada a existência de ciclos completos deste parasita em *D. marsupialis* experimental e naturalmente infectados^{12,22}.

Entre didelfídeos, os índices de infecção para esse flagelado, em diferentes regiões do Brasil, variam de 18,6 a 91,7%^{1,14,19,21}. Nos demais países americanos, tais índices variam entre 17 e 74,2%⁶. Esses altos valores poderiam ser devidos a uma parasitemia de longa duração em tais animais¹.

O xenodiagnóstico, enquanto técnica para triagem de hospedeiros não humanos infectados por tripanossomos, revelou melhor sensibilidade que as demais técnicas para o encontro de *Trypanosoma* tipo *cruzi*. A freqüência da infecção para este protozoário, diagnosticado por tal técnica, foi de 12,28% (21/171) entre os marsupiais. Se considerarmos somente os resultados referentes a *D. marsupialis* e *P. opossum*, capturados nas estações de Iguape e Itapetininga, locais onde

foram encontrados gambás naturalmente infectados por *T. cruzi*, o xenodiagnóstico positivou-se em 35,0% (21/60) dos exemplares examinados. Para o município de Iguape, o xenodiagnóstico em *D. marsupialis* mostrou a infecção para o tripanossomo em 41,67% (15/36), a hemocultura em 8,3% (3/36); o esfregaço sangüíneo e o exame de sangue a fresco 2,78% (1/36).

A frequência da infecção por *Trypanosoma* do subgênero *Herpetosoma* em *Proechimys iheringi* atingiu 88,9% (16/18). O esfregaço sangüíneo e o exame de sangue a fresco revelaram 100% de positividade dos exemplares diagnosticados. As técnicas do xenodiagnóstico e da hemocultura foram sempre negativas, exceção feita a duas hemoculturas cuja formulação do meio de Ducrey incluiu 2% de sangue de *P. iheringi*, que mostraram intensa proliferação de formas epimastigotas. *Trypanosoma* do subgênero *Herpetosoma* tipo *lewisi*, caracteristicamente, mostram-se muito exigentes quanto aos requerimentos nutricionais; isto talvez explique a extrema especificidade para escolha do hospedeiro, quer seja vertebrado quer seja invertebrado²⁴.

Trypanosoma do subgênero *Trypanozoon* tipo *evansi*, foi observado em 52, 78% (19/36) dos cães examinados. Todos os cães positivos foram diagnosticados através das técnicas do esfregaço sangüíneo e do exame de sangue a fresco. O xenodiagnóstico e a hemocultura foram sempre negativos. As dificuldades verificadas nas tentativas

de cultivo destes tripanossomos certamente estarão relacionadas com suas exigências nutricionais e seu alto consumo de açúcares. A negatividade dos xenodiagnósticos praticados em cães que revelaram altíssima parasitemia no sangue circulante talvez esteja relacionada com a perda da capacidade de *Trypanosoma* do complexo *evansi* em efetuar parte de seu ciclo ontogênico em um inseto hospedeiro, tendo por isso assumido a transmissão mecânica²⁶.

Para finalizar, os autores acreditam ser lícito concluir que as técnicas parasitológicas de demonstração de flagelados do gênero *Trypanosoma* são eficazes na determinação de hospedeiros não humanos naturalmente infectados. Todavia, deve-se ter em consideração que, se para *Trypanosoma* tipo *cruzi* a técnica do xenodiagnóstico se mostra mais efetiva para tal triagem, são as técnicas do exame de sangue a fresco e do esfregaço sangüíneo as mais úteis e corretas quando a preocupação for *Trypanosoma* tipo *lewisi* ou tipo *evansi*.

Agradecimentos

Os autores manifestam-se agradecidos aos senhores Antonio Silva Araujo, Carlos Roberto Elias e Rui Larosa, do Instituto Adolfo Lutz, pela extrema dedicação e competência com que realizaram os serviços de captura de animais silvestres.

RIALA6/664

TOLEZANO, J.E.; NUNES, E.V.; D'ANDRADE, O.M.; ARAUJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; CHIEFFI, P.P.; WESTPHALEN, S.R.; GUILHERME, C.S.; VALENTIM, A.M. & PEREIRA, L.E. - Parasitologic technics for investigation of naturally infected animals by flagellates of genus *Trypanosoma* Gruby, 1843. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1) 85-92, 1989.

ABSTRACT: In this paper, we tried to confront the technics fresh blood examination, stained blood films, hemoculture and xenodiagnosis as laboratorial procedures to investigate non-human hosts naturally infected by flagellates of genus *Trypanosoma*. From a total of 440 animals belonging to 22 different species, 57 (12.95%) revealed trypanosomes in blood circulation. The xenodiagnosis showed the most effective technic to demonstrate *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in *Didelphis marsupialis* and *Philander opossum*. In *Nasua nasua*, *T. cruzi* was seen in all procedures utilized. On the other hand, the fresh blood examination and stained blood films were more efficient than the other technics to *T. (Herpetosoma) and T. (Trypanozoon) evansi* in infected *Proechimys iheringi* and *Canis familiaris*, respectively.

DESCRIPTORS: *Trypanosoma* in non-human hosts, diagnosis, parasitologic technics.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETTO, M.P. - Epidemiologia. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z., ed. - *Trypanosoma cruzi* e *Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1979. p. 89-151.
2. BARRETTO, M.P. - Possible role of wild mammals and triatomines in the transmission of *Trypanosoma cruzi* to man. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEW APPROACHES IN AMERICAM TRYPANOSOMIASIS RESEARCH. Belo Horizonte p. 307-A18. (PAHO Sci. Publ., 318)
3. BARRETTO, M.P. - Reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. In: CANÇADO, J.R., ed. - *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 163-8.
4. BARRETTO, M.P. - Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* e sua identificação como agente etiológico da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 7: 305-15, 1965.
5. BARRETTO, M.P. & RIBEIRO, R.D. - Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39:25-36, 1979.

6. BARRETTO, M.P.; SIQUEIRA, A.F.; CORRÊA, F.M.A.; FERRIOLLI FILHO, F & CARVALHEIRO, J.R. – Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VIII - Investigações sobre a infecção natural de gambás por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. *Rev. bras. Biol.*, 24: 289-300, 1964.
7. DEANE, L.M. – Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. bras. Malariol. Doenças trop.*, 16:27-48, 1964.
8. DEANE, L.M. – Encontro de tripanossomo do tipo *rangeli* em gambás da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis*. *Rev. bras. Malariol. Doenças trop.*, 10:451-7, 1958.
9. DEANE, L.M. – Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 3:15-28, 1961.
10. DEANE, L.M. – Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. III. Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres dos arredores de Belém, Pará. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 6: 225-32, 1964.
11. DEANE, L.M. – Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. IV. Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres da Estrada Belém-Brasília. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 9:143-8, 1967.
12. DEANE, M.P.; LENZI, H.L. & JANSEN, A.M. – *Trypanosoma cruzi* vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host. the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 513-5, 1984.
13. FORATTINI, O.P.; JUAREZ, E.; RABELLO, E.X.; PATTOLI, D. & CORREA, R. – Infestação domiciliar por *Triatoma infestans* e alguns aspectos epidemiológicos da tripanossomose americana em área do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, 3:159-72, 1969.
14. GUIMARÃES, F.N. & JANSEN, G. – Novo transmissor silvestre do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 38:437-41, 1943.
15. HOARE, C.A. – *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Oxford, Blackwell, 1972. 749 p.
16. LAINSON, R.; SHAW, J.J.; FRAIHA, H.; MILES, M.A. & DRAPER, C.C. – Chagas disease in the Amazon Basin: I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and in the State of Pará, north Brazil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 73: 193-204, 1979.
17. LANETI, G.T.P. – Didelídeos (Mammalia: Marsupialia) como reservorios silvestres del *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 en la zona del Palmar Ramireño, Distrito Cordoba en el Estado Táchira, Venezuela: primeira comprobacion. *Kasnera*, 7:1-40, 1979.
18. MOLYNEUX, D.H. – Biology of trypanosomes of subgenus *Herpetosoma*. In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A., ed. – *Biology of the kinetoplastida*, London. Academic Press, 1976. v.1. p. 285-325.
19. RODRIGUES, B.A. & MELLO, G.B. – Contribuição ao estudo da tripanosomíase americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 37: 77-94, 1942.
20. RODRIGUES, V.L.C.C.; FERRAZ Fº, A.N.; D'ANDRADE, O.M.; TOLEZANO, J.E.; CHIEFFI, P.P.; TAKEDA, G.K.F.; ALMEIDA, M.C.R.R.; LAZZARO, E.S.M. & SCANDAR, S.A.S. – Mal de cadeiras em cães do município de Olímpia no Estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 9º, Fortaleza, 1985. *Resumos e programas*. p.31.
21. SILVA, E.O.R.; ANDRADE, J.C.R. & LIMA, A.R. – Importância de animais sinantrópicos no controle de endemia chagásica. *Rev. Saúde públ.*, 9:371-81, 1975.
22. STEINDEL, M.; SCHOLZ, A.F.; TOMA, H.K. & SCHLEMPER Jr., B.R. – Presence of *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of naturally infected opossum (*Didelphis marsupialis*) in the State of Santa Catarina Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83:135-7, 1988.
23. TELFORD, S. R., Jr & TONN, R.J. – Dinámica de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones de un reservorio primario, *Didelphis marsupialis* en los llanos altos de Venezuela. *Bol. of sanit. Panam.*, 93:341-64, 1982.
24. TOLEZANO, J.E.; CHIEFFI, P.P.; DIAS, R.M.D.S.; NUNES, E.V.; D'ANDRADE, O.M.; PEREIRA, L.E.; TORRES D.M.A.G.V. & LUPPETI, N. – *Trypanosoma* do subgênero *Herpetosoma* Doflein, 1901 em *Proechimys iheringi* Thomas, 1911 capturados no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44:47-53, 1984.
25. TORRES, D.M.A.G.V.; DIAS, R.M.D.S.; CHIEFFI, P.P.; TOLEZANO, J.E. & NAGAMORI, A.H. – Hemoparasitas de quirópteros e marsupiais capturados no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*; 43:47-53, 1983.
26. VICKERMAN, K. – The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A. – *Biology of the Kinetoplastida*. London, Academic Press, 1976. v. 1 p.1-34.

Recebido para publicação em 3 de março de 1989.

ENTEROPARASIToses NO ESTADO DE SÃO PAULO: QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA

Eliseu Alves WALDMAN *
Pedro Paulo CHIEFFI **

RIALA6/665

WALDMAN, E.A. & CHIEFFI, P.P. - Enteroparasitoses no Estado de São Paulo: questão de saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):93-99, 1989.

RESUMO: São apresentadas e discutidas informações disponíveis referentes à frequência e distribuição das enteroparasitoses em áreas do Estado de São Paulo, assinalando a importância que tais parasitoses assumem, atualmente, nesse Estado, especialmente se comparadas com outras como a malária e a doença de Chagas, já controladas. Verificou-se, nas últimas décadas, uma diminuição acentuada da ocorrência das enteroparasitoses, evidenciando-se, no entanto, que sua frequência é ainda elevada em alguns locais do Estado, atingindo especialmente crianças pertencentes aos segmentos mais pobres da população, residentes em habitações precárias. Tal situação justifica a implementação de programa para seu controle. Sugere-se o estudo de medidas tais como o tratamento específico em massa, para verificação de sua eficácia em nossa estrutura epidemiológica.

DESCRIPTORIOS: enteroparasitoses, epidemiologia, São Paulo, Brasil; enteroparasitoses, programas de saúde.

INTRODUÇÃO

Expressivas modificações ambientais ocorreram no Estado de São Paulo nas primeiras décadas deste século, principalmente em função da expansão das fronteiras agrícolas determinada pelo crescimento da cultura cafeeira. A economia do Estado àquela época, era predominantemente agro-exportadora e a população distribuía-se, em sua maioria, nas áreas rurais de seu território².

A derrubada das matas para o desenvolvimento de atividades agrícolas, a penetração do homem e a forma pela qual se deu sua inserção nos modos de produção levaram a alterações ecológicas, criando condições favoráveis ao surgimento de doenças parasitárias que passaram a atingir, de forma endêmica, amplas áreas do Estado.

Entre as parasitoses que adquiriram maior relevância em saúde pública merecem citação a

leishmaniose tegumentar, a doença de Chagas, a malária e a ancilostomíase.

Já nas décadas de 1930 e 1940, vários parasitologistas, entre eles Samuel Pessoa, alertaram as autoridades sanitárias para a importância das enteroparasitoses, face as suas altas prevalências, tanto nas áreas rurais como urbanas do Estado de São Paulo¹¹.

Vários inquéritos desenvolvidos àquela época permitem o dimensionamento desta questão. Pessoa & Pascale (1948), estudando escolares do Estado de São Paulo, verificaram taxa de ancilostomíase, variando de 53% na capital a 100% em áreas do litoral¹³. Pessoa (1938) e Pessoa & Lucena (1938) observaram, em crianças do Estado de São Paulo, frequência de ascariíase, variando de 80% na capital a 93% no litoral¹³.

* Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP e da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, SP.

** Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP., e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

Tal situação induziu as autoridades sanitárias a desenvolverem programas de controle de parasitoses intestinais, visando particularmente escolares, que foram realizados, com maior ênfase, até os anos 50, centrados no tratamento seletivo em massa e na educação sanitária. Os resultados dessas campanhas nunca foram devidamente avaliados; porém até hoje, é perceptível aos profissionais de saúde a preocupação da população, com referência às crianças, quanto ao problema das parasitoses intestinais.

O aparecimento, na década de 1950, dos inseticidas de ação residual e de drogas mais eficazes ou menos tóxicas permitiram que se conferisse prioridade aos programas de erradicação da malária e controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo. Esses programas desenvolveram-se com êxito: a malária foi controlada e a doença de Chagas teve sua transmissão por triatomíneos interrompida no Estado de São Paulo, desde o início dos anos 70.

Nas últimas três décadas foi conferida alguma ênfase a programas de controle da esquistosomose mansônica no Estado, porém, sem resultados expressivos, apesar de a transmissão ocorrer em limitadas áreas de seu território⁵.

Em função dos programas de controle e da maneira pela qual se deu o processo de urbanização do Estado de São Paulo, as referidas doenças parasitárias perderam o caráter exclusivo de endemias rurais. A doença de Chagas persiste por meio da transmissão pela transfusão sanguínea, a leishmaniose ocorre nas cercanias de cidades, a esquistosomose mansônica apresenta, em algumas regiões, transmissão exclusivamente urbana⁵.

Situada a questão das doenças parasitárias no Estado de São Paulo, em seus contornos gerais, passaremos a analisar, como objetivo desse trabalho, a frequência e distribuição atual das enteroparasitoses nesse Estado, com base em dados recentes, disponíveis na literatura, buscando demonstrar que as mesmas devem, nos dias atuais, ser consideradas prioridade com referência às demais doenças parasitárias, à exceção da esquistosomose mansônica e, em circunstâncias especiais, da malária.

SITUAÇÃO ATUAL DAS ENTEROPARASITÓSES NO ESTADO DE SÃO PAULO

Antes de iniciarmos a análise dos dados disponíveis referentes ao assunto, vale salientar que estes não são representativos de todos os segmentos da população; todavia, a similitude dos resultados obtidos pelos diversos trabalhos publicados,

utilizando diferentes metodologias, conferem consistência a essas informações, permitindo situá-las próximas à realidade.

Analisando as tabelas 1 e 2, publicadas por CHIEFFI⁴ et alii⁴ e recentemente atualizadas¹⁴, verificamos que nas duas últimas décadas houve, na área metropolitana, acentuada diminuição das taxas de ascariíase, tricuriíase, ancilostomíase e estrongiloidíase; variações menos acentuadas ocorreram com referência a giardíase, amebíase e esquistossomose.

Vale salientar, ainda em relação à área metropolitana, que as taxas mais elevadas de infecção pelo *S. mansoni*, na década de 70, devem-se, provavelmente, a aumento de sua pesquisa em populações de migrantes oriundos de regiões do país com alta prevalência dessa parasitose.

No interior do Estado, considerando o mesmo período, verificamos tendência semelhante de decréscimo, ainda que menos acentuada, com exceção da ancilostomíase, cuja frequência sofreu queda bastante significativa a partir da década de 70.

A queda das taxas de infecção por geo-helminetos, nas últimas décadas, deveu-se, provavelmente, a processo de urbanização e melhoria das condições de vida da população, tal como sugerem alguns indicadores de saúde.

A tabela 3 apresenta taxas de enteroparasitoses referentes a 1987, abrangendo os mesmos segmentos da população estudados nas tabelas 1 e 2, distribuídos em 12 áreas geoeconomicamente homogêneas que, até recentemente, correspondiam às das divisões administrativas do Estado de São Paulo.

Excluída a área metropolitana já analisada, verificamos na tabela 3 que a giardíase, mesmo considerando variações regionais, apresenta sempre taxas elevadas. Entre os geo-helminetos, a ascariíase e a tricuriíase mostram-se importantes na região da Baixada Santista, enquanto a ancilostomíase destaca-se na região de Araçatuba. No entanto, é no vale do Ribeira que os geo-helminetos apresentam índices expressivamente elevados.

O comportamento da ascariíase e tricuriíase na Região de Santos, área predominantemente urbana, deve-se provavelmente ao fato de importante segmento de sua população viver em habitações precárias e sem infra-estrutura adequada. A elevada taxa de ancilostomíase na área de Araçatuba pode ser atribuída, também, a inadequadas condições de urbanização na periferia das cidades que compõem essa região.

TABELA 1

*Freqüência de enteroparasitas em clientes de unidades sanitárias da região metropolitana de São Paulo, de acordo com resultados obtidos pelo serviço de parasitologia do Instituto Adolfo Lutz durante o período de 1960-1987**

<i>Freqüência</i> <i>Ano</i>	<i>A. lumbricoides</i>	<i>T. trichiura</i>	<i>Ancylostomidae</i>	<i>S. stercoralis</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Total de amostras
1960	33,1	21,6	5,3	4,8	1,5	13,5	2,8	22.097
1967	42,9	36,5	7,3	4,8	1,4	15,2	4,4	47.131
1969	43,8	36,8	7,6	4,6	2,2	14,3	3,1	55.386
1971	31,9	35,1	10,0	4,5	4,0	11,2	3,4	49.787
1974	30,0	30,7	8,8	3,8	4,6	10,1	2,5	72.303
1976	23,3	22,3	6,2	2,7	3,6	10,2	2,0	86.223
1979	23,2	22,4	6,1	2,7	3,7	12,6	2,1	62.002
1987	15,7	13,6	2,8	0,7	1,7	10,3	1,7	73.826

* Fonte: tabela apresentada por CHIEFFI et alii⁴, atualizada por Waldman¹⁴.

TABELA 2

*Freqüência de enteroparasitas em clientes de centros de saúde localizadas no interior do Estado de São Paulo, de acordo com resultados obtidos pelas unidades da Divisão de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, durante o período de 1960-1987**

<div style="text-align: center;">Freqüência</div> <div style="text-align: center;">Ano</div>	<i>A. lumbricoides</i>	<i>T. trichiura</i>	<i>Ancylostomidae</i>	<i>S. stercoralis</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Total de amostras
1960	31,2	18,2	28,2	6,6	1,5	11,0	1,5	133.665
1962	32,8	22,0	30,8	6,5	1,2	10,9	1,0	156.526
1964	30,7	20,0	21,9	6,1	0,8	12,7	1,1	193.774
1966	38,1	27,0	19,6	4,7	0,7	7,9	0,9	265.935
1968	28,8	20,1	24,5	5,9	0,9	10,0	1,1	209.202
1970	32,8	23,6	22,3	5,2	0,9	11,4	1,0	321.663
1973	26,3	21,7	19,4	5,4	1,1	9,8	0,5	405.435
1975	24,5	17,7	16,1	3,4	1,1	10,8	0,4	346.516
1977	20,1	13,4	14,4	3,3	1,1	11,6	0,3	292.724
1979	17,0	10,4	9,2	3,2	2,0	11,5	0,7	342.322
1987	16,6	9,7	6,6	1,5	0,9	10,7	0,4	250.330

* Fonte: tabela apresentada por CHIEFFI et alii⁴, atualizada por Waldman¹⁴.

TABELA 3

Freqüência de enteroparasitas em clientes de centros de saúde localizadas nas 12 áreas geoeconomicamente homogêneas do Estado de São Paulo, segundo resultados obtidos nas unidades da Divisão de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz - 1987*.

Administração Regional \ Freqüência	<i>A. lumbricoides</i>	<i>T. trichiura</i>	<i>Ancylostomidae</i>	<i>S. stercoralis</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	Total de amostras
Metropolitana	15,7	13,6	2,8	0,7	1,7	10,3	1,7	73.826
Santos	34,3	23,6	6,1	0,07	2,3	20,4	0,5	29.969
Vale do Paraíba	13,7	8,6	2,0	2,5	0,4	8,7	0,9	14.705
Sorocaba	17,5	9,2	2,7	1,4	0,5	16,4	0,2	26.345
Campinas	10,8	5,0	6,0	1,4	1,5	8,4	0,5	44.886
Ribeirão Preto	9,0	4,0	5,1	2,1	0,8	9,8	0,9	16.291
Araçatuba	8,3	3,5	11,5	3,7	0,02	18,6	0,0	19.244
Presidente Prudente	12,7	7,3	6,9	0,6	0,3	11,9	0,2	14.434
Bauru	13,4	11,8	8,4	0,5	0,3	11,1	0,3	26.325
São José do Rio Preto	3,2	1,4	5,7	0,8	0,5	9,4	0,2	17.508
Marília	11,7	6,8	6,0	2,2	0,3	10,3	0,2	16.156
Vale do Ribeira	36,3	18,3	11,5	2,4	1,6	9,0	1,1	24.467

* Divisão Administrativa vigente no Estado de São Paulo até 1986.

A situação das geo-helminthoses no vale do Ribeira constitui, seguramente, a questão mais importante e pode ser explicada pelo baixo nível de desenvolvimento sócio-econômico e alta proporção de habitantes que nessa região vivem em zona rural (40%)¹, a mais elevada do Estado, além das precárias condições habitacionais e de saneamento.

Analisados esses dados que oferecem visão geral da situação das enteroparasitoses no Estado de São Paulo, cabe menção especial a recente publicação de MONTEIRO et alii² abrangendo amostra representativa das crianças de até 5 anos, residentes no município de São Paulo.

Os resultados apresentados nessa pesquisa revelam elevadas prevalências de ascaridíase, tricuriíase e giardiíase atingindo, respectivamente, 16,4%, 12,6% e 14,5% para as faixas etárias de 0 a 5 anos; no entanto, entre as crianças situadas no sexto ano de vida, as taxas para esses parasitas, na mesma ordem, atingem índices de, respectivamente, 19,9%, 21,5% e 23,9%. Neste último grupo etário, 19% das crianças são infectadas por dois ou mais enteroparasitas.

Informação não publicada*, mas obtida no trabalho de Monteiro et alii², referente a sub-amostra das crianças residentes em favelas do município da capital, apresenta, para a faixa etária de 0 a 5 anos, prevalências de 39,2%, 31,4% e 21,6%, respectivamente, para ascaridíase, tricuriíase e giardiíase. Esses dados são preocupantes pois estima-se que 12% da população infantil do município de São Paulo seja constituído por crianças residentes em favelas, e cerca de 30% da referida população reside em domicílios de um único cômodo³.

Pesquisa efetuada por CHIEFFI et alii³, no município de Guarulhos, localizado na área metropolitana de São Paulo, numa amostra representativa de 30.000 escolares de 6 a 14 anos, residentes em área ocupada por população de baixa renda, obteve prevalências de 40%, 30% e 13%, respectivamente, de ascaridíase, tricuriíase e giardiíase.

As elevadas freqüências de parasitismo intestinal encontradas em nosso meio, especialmente nas faixas etárias mais jovens, devem representar

motivo de preocupação para as autoridades sanitárias, uma vez que a estes parasitas têm sido atribuídos efeitos deletérios que, somados a outros agravos muitas vezes incidentes nesses segmentos da população, geralmente constituídos por indivíduos situados nos extratos socio-econômicos menos privilegiados, favorecem o surgimento e perpetuação de quadros de desnutrição e diarreia crônicas^{6,7}.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados tornam incontestes o fato de as enteroparasitoses ainda constituírem, no Estado de São Paulo, problema de saúde pública, especialmente nos denominados cinturões de pobreza da região metropolitana da capital e no Vale do Ribeira.

A solução definitiva dessa questão está condicionada a mudança da estrutura epidemiológica favorável a altas taxas de infecção por esses parasitas, fato possível somente por meio da melhoria das condições de vida da população. No entanto, a atual prevalência de enteroparasitoses no estado de São Paulo justifica a elaboração e implementação de programa para seu controle.

Programas com esses objetivos foram desenvolvidos por outros países, em situação epidemiológica aparentemente semelhante, utilizando, com sucesso, o tratamento específico em massa e medidas simplificadas de saneamento, especialmente quanto ao destino adequado de dejetos. Exemplos bastante significativos são os programas de controle de geo-helminthoses efetuados pelo Japão e Coreia do Sul que reduziram drasticamente as prevalências de ascaridíase, tricuriíase e ancilostomíase nesses países^{10,12}.

A aplicação de medidas semelhantes em nosso meio deve, no entanto, implicar em prévio estudo da eficácia dessa estratégia em nossa estrutura epidemiológica, procurando pesquisar, especialmente, a dinâmica de transmissão das enteroparasitoses, para que se compreendam, adequadamente, os mecanismos responsáveis pela reinfeção dos indivíduos submetidos a terapêutica específica.

* Comunicação pessoal do Dr. Carlos Augusto Monteiro, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, SP.

WALDMAN, E.A. & CHIEFFI, P.P. - Enteroparasitoses in São Paulo State: problems of public health. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):93-99, 1989.

ABSTRACT: Available information concerning the enteroparasitosis frequency and distribution in areas of São Paulo State, Brazil, are presented and discussed, stressing the importance that such parasitosis assume presently in this State, especially, if compared with other already controlled parasitosis as malaria and Chaga's disease. In the last decades it has been verified a pronounced decrease of enteroparasitoses occurrence, however, its frequency in some parts of the State is still high, especially in children belonging to the poorest segment of population living in precarious habitational conditions. Such situation justifies the establishment of its control programme, suggesting the study of some measures such as the specific mass treatment to verify its efficacy in our epidemiological structure.

DESCRIPTORS: intestinal diseases, parasitic, São Paulo, Brasil; intestinal diseases, parasitic, health planning; intestinal diseases, parasitic, epidemiology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - *Sinopse preliminar do Centro: São Paulo, IX recenseamento Geral do Brasil - 1980*. Rio de Janeiro, IBGE, 1981. v. 1, nº 18. 182 p.
- CAMARGO, J.F. - Crescimento da população no Estado de São Paulo e seus aspectos econômicos. *Bol. Fac. Cienc. Letras Univ. São Paulo (Sér. Economia polit., Hist. Doutr. Econ., 153(1):1-298, 1952.*
- CHIEFFI, P.P.; WALDMAN, E.A.; TORRES, D.M.C.V.; SHIMARA, R.; MIZUMOTO, L.C.; SILVA, A.M.A. & UEHARA, M. - Enteroparasitoses no município de Guarulhos, SP, Brasil. 1. Prevalência de infecções entre escolares residentes no bairro de Taboão, em junho de 1984. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2): 75-80, 1988.
- CHIEFFI, P.P.; WALDMAN, E.A.; WALDMAN, C.C.S.; SAKATA, E.E.; GERBI, L.S.; ROCHA, A.B. & AGUIAR, P.R. - Aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. paul. Med.*, 99(3): 34-6, 1982.
- ENCONTRO SOBRE ESQUISTOSSOMOSE, 2ª, São Paulo, 1982. - *Situação da esquistossomose no Estado de São Paulo*. São Paulo, SUCEN, 1982. Relatório.
- FARTHING, M.J.G.; MATA, L.; URRUTIA, J.J. & KROREMAL, R.A. - Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact in physical growth. *Am. J. clin. nutr.*, 43 () 395-405, 1986.
- GRUPTA, M.C. - Intestinal parasitic infection and malnutrition. *Indian J. Pediatr.*, 47:503-9, 1980.
- MONTEIRO, C.A.; CHIEFFI, P.P.; BENICIO, M.H.D'A.; DIAS, R.M.S.; TORRES, D.M.A.G.V. & MANGINI, A.C.S. - Estudo das condições de saúde das crianças no município de São Paulo (Brasil), 1984-1985. VII: Parasitoses intestinais. *Rev. Saúde públ.*, 22(1):8-15, 1988.
- MONTEIRO, C.A.; PINO ZUÑIGA, H.P.; BENICIO, M.H.D'A. & SZARJAC, S.C. - Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984-1985. I: Aspectos metodológicos, características sócio-econômicas e ambiente físico. *Rev. Saúde públ.*, 20(6): 435-45, 1986.
- MORISHITA, K. - Present situation of parasitic infection in Japan and activity of the Japan Association of Parasitic Control. In: ASIAN PARASITE CONTROL ORGANIZATION. Research Group - *Collected papers on the control of soil-transmitted helminthiasis*. Tokyo, APCO, 1980. v. 1, p. 83-6.
- PESSOA, S.B. apud VERONESI, R.¹³.
- SEO, B.-S. - Control problems of ascariasis in Korea with special reference on the related Biology and epidemiology. In: APCO RESEARCH GROUP - *Collected papers on the control of soil-transmitted helminthiasis*. Tokyo, The Asian Parasitic Control Organization, 1983. v. 2, p. 194-216.
- VERONESI, R. - *Doenças infecciosas e parasitárias*. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1969. p. 808-28.
- WALDMAN, E.A. - Enteroparasite epidemiological aspects in São Paulo State, Brazil, and their public health significance. In: SEMINAR ON PARASITE CONTROL ADMINISTRATION FOR SENIOR OFFICERS, Tokyo, 1988. Tokyo, Japan International Cooperation Agency, 1988. p. 1-14.

REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA TOXOPLASMOSE EM PACIENTES COM SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA.*

Cláudia Barleta do NASCIMENTO**
José Eduardo TOLEZANO**
Massami KAWARABAYASHI**
José dos Reis COELHO**
Maria Lúcia RAYMUNDO**
Vanda de Sá LÍRIO**
Mirthes UEDA**
Ana Maria Carvalho de SOUZA**
Luciana FERRARI***
Walquíria P. PINTO***

RIALA6/666

NASCIMENTO, C.B.; TOLEZANO, J.E.; KAWARABAYASHI, M.; COELHO, J.R.; RAYMUNDO, M.L.; LÍRIO, V.S.; UEDA, M.; SOUZA, A.M.C.; FERRARI, L. & PINTO, W.P. – Reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):101-106, 1989.

RESUMO: Foram processadas 1.050 amostras de soro e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR) de 450 pacientes do Estado de São Paulo com pesquisa positiva para anticorpos anti-HIV. Foi estudada a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* através da reação de imunofluorescência indireta nesses pacientes. Foram dosados anticorpos anti-*T. gondii* das classes Ig total e IgM específico. Os resultados revelaram positividade para Ig total nas amostras de soro e LCR em 69,1% e 47,3%, respectivamente. Em relação às imunoglobulinas IgM, a sorologia mostrou-se positiva em 2,8% das amostras. Observou-se ainda elevada reatividade para Ig total em amostras de LCR (61,2%) em pacientes com quadro clínico compatível com toxoplasmose. A concomitância de positividade em amostras de soro e LCR mostrou-se crescente, quanto mais avançada a fase clínica em que os pacientes com SIDA (AIDS) se encontravam. Em pacientes do grupo IV (ARC) da SIDA, quando os títulos de Ig total no soro sanguíneo foram ≥ 1.024 , a concomitância de positividade no LCR foi de 80%.

DESCRIPTORIOS: toxoplasmose em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA); SIDA, prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii*.

INTRODUÇÃO

A infecção por *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 é uma protozoose de distribuição mundial, que afeta animais de diferentes espécies, aves e mamíferos, incluindo o homem^{4,18}.

A quase totalidade dessas infecções ocorre sem qualquer associação com quadro clínico¹⁸. Nos E.U.A., estima-se que a prevalência da

infecção entre adultos com mais de 50 anos esteja entre 30 e 40%¹⁸ ou entre 20 e 70%⁸ dessa população. Na França, a infecção por *T. gondii* é mais prevalente, avaliando-se que aproximadamente 80% de sua população seja infectada¹¹. No Brasil, estudos em diferentes populações adultas de diferentes Estados, revelaram prevalência entre 50 e 80%^{1,2,3,5,6,7,16}.

Até recentemente, a toxoplasmose cerebral era considerada complicação relativamente rara, sendo registrada em indivíduos que mostrassem

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Centro de Referência e Treinamento para AIDS, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, S.P.

alguma outra manifestação clínica, acompanhada por depressão da imunidade celular^{11,12,13,17}.

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) a prevalência da toxoplasmose cerebral apresentou um acréscimo significativo.

A AIDS caracteriza-se por distúrbios na imunidade celular, os quais potencializam o aparecimento de infecções oportunistas em indivíduos anteriormente saudáveis¹⁵. Significante porcentagem dos pacientes portadores de AIDS apresenta complicações nervosas¹⁵.

Tanto no que concerne às infecções oportunistas, como em relação às manifestações nervosas, a toxoplasmose parece contribuir com relativo destaque.

A encefalite toxoplásmica é considerada uma das maiores causas de infecção do sistema nervoso central, em pacientes acometidos de AIDS.

Na dependência de fatores de risco que dispõem ao desenvolvimento da AIDS e à prevalência da infecção crônica por *T. gondii*, a encefalite toxoplásmica clinicamente aparente tem sido registrada entre 3 e 40% dos pacientes de AIDS¹¹. Na França, cerca de 25% de todos os indivíduos portadores de AIDS desenvolvem quadro de encefalite toxoplásmica¹¹. Estima-se, porém, que, se a tendência ao aparecimento de novos casos com estas complicações nervosas continuar nos níveis atuais, em 1991 ocorrerão entre 20.000 e 40.000 casos de encefalite por *T. gondii*, nos pacientes de AIDS dos E.U.A.¹¹.

Tendo em vista a enorme importância imputada à infecção por *T. gondii* em pacientes de AIDS em outros países, torna-se imperioso o conhecimento da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, em nosso meio.

No presente estudo, objetivou-se relatar a experiência laboratorial de diagnóstico da toxoplasmose através da reação de imunofluorescência indireta¹(RIFI), em amostras de soro sanguíneo e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR) de 450 pacientes com pesquisa positiva para anticorpos anti-HIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra investigada

Este estudo foi realizado com uma população de 450 indivíduos, todos com pesquisa positiva para anticorpos anti HIV. Do total de pacientes examinados, 436 (96,9%) eram do sexo masculino e 14 (3,1%) do feminino. Em relação ao grupo de risco para AIDS, 229 (50,89%) pacientes relataram práticas homossexuais, 106 (23,55%), bissexuais e 31 (6,89%), heterossexuais; 14 (3,11%) eram toxicômanos. Um total de 3 hemofílicos (0,67%) e de 4 indivíduos com relato de transfusão sanguínea ou de hemoderivados (0,89%) foi registrado. Dos 450 pacientes, 362 (80,44%) se encontravam na faixa etária de 21 a 40 anos. Em relação à fase clínica da AIDS, esses indivíduos estavam assim distribuídos: 325 (72,2%) pertenciam ao grupo IV (subgrupo A – ARC); 94 (20,9%) ao grupo III (linfadenopatia persistente generalizada – LAS) e 31 (6,9%) ao grupo II (infecção assintomática). Quadro de manifestações clínicas compatíveis com infecção toxoplásmica foi registrado em 105 (23,3%) pacientes.

Reações de imunofluorescência indireta efetuadas

Foram processadas 1.050 amostras para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* através da RIFI, sendo 760 (72,4%) de soro sanguíneo e 290 (27,6%) de LCR. Nestas amostras foram dosados anticorpos anti-*T. gondii* das classes Igtotal e IgM específico (tabela 1).

TABELA 1

Presença de anticorpos específicos para toxoplasmose, demonstrada pela técnica de imunofluorescência indireta, em amostras de soro e líquido de pacientes infectados por HIV *

Classe de anticorpo	Tipo de amostra	Soro		Líquor	
		n ^o	(%)	n ^o	(%)
Igtotal		689	(90,7)	256	(88,3)
IgM		71	(9,3)	34	(11,7)
Total de amostras		760	(100,0)	290	(100,0)

* Infecção por HIV demonstrada pela técnica ELISA.

De 235 pacientes, foram examinadas duas ou mais amostras de soro sanguíneo ou LCR, ou foram examinadas concomitantemente amostra de soro e LCR de um mesmo paciente. De 215 pacientes, foi examinada somente uma amostra de soro ou LCR (tabela 2).

Dos 105 pacientes com quadro clínico compatível com toxoplasmose, foram examinadas

amostras de soro e, de LCR, de apenas 67 pacientes.

RESULTADOS

A tabela 3 mostra a distribuição dos resultados das dosagens de anticorpos Igtotal anti-*T. gondii* em 450 pacientes com pesquisa positiva para anticorpos anti-HIV, segundo o tipo de amostra examinada.

TABELA 2

*Distribuição dos pacientes infectados por HIV, segundo número de amostras de soro sanguíneo e/ou líquido, examinadas pela técnica de imunofluorescência indireta para toxoplasmose **

Nº de pacientes	Tipo de amostra	Tipo de amostra		
		Soro	Líquor	Soro e líquido
Com amostra única		187	28	—
Com mais de 1 amostra		91	6	138
Total de pacientes		278	34	138

* Infecção por HIV demonstrada pela técnica ELISA.

TABELA 3

*Distribuição das 945 dosagens de Igtotal pela técnica de imunofluorescência indireta, para toxoplasmose, de pacientes infectados por HIV, segundo resultado e tipo de amostra**

Resultado	Tipo de amostra	Soro		Líquor	
		nº	(%)	nº	(%)
Reagente		476	(69,1)	121	(47,3)
Não reagente		213	(30,9)	135	(52,7)
Total de amostras		689	(100,0)	256	(100,0)

* Infecção por HIV demonstrada pela técnica ELISA.

As dosagens de Igtotal revelaram positividade em 476 amostras (69,1%) de soro e em 121 amostras (47,3%) de LCR. Somente 3 amostras, nas quais foi realizada pesquisa de imunoglobulinas IgM anti-*T. gondii*, revelaram-se reagentes, sendo que as três eram de soro sanguíneo. Estas três amostras pertenciam a três pacientes do subgrupo A da fase ARC da AIDS, sendo que dois deles com relato de práticas homossexuais, dos quais um apresentava quadro de toxoplasmose cerebral. O terceiro paciente apresentava história de transfusão sanguínea e irritação ocular. Nestes três pacientes, as dosagens de Igtotal no soro resultaram sempre ≥ 1.024 .

Dentre os pacientes com quadro clínico compatível com toxoplasmose, 71 (67,6%) e 41 (61,2%) apresentaram reatividade para Igtotal no soro e LCR, respectivamente.

Na fase ARC, 73,8% e 66,0% dos pacientes foram reagentes para Igtotal no soro e LCR, respectivamente. Dos pacientes com sorologia Igtotal positiva, 64,0% apresentaram anticorpos Igtotal anti-*T. gondii* também no LCR.

Ao examinarmos a concomitância de positividade no soro e LCR à luz de uma soropositividade ≥ 1.024 , observamos que no grupo IV esta concomitância atinge 80%, enquanto que nos grupos III e II esta percentagem está em torno de 40% e 10%, respectivamente.

Ainda, nos grupos III e IV foi observado 85% de concomitância de negatividade no soro e LCR.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Desde a descrição da AIDS há alguns anos atrás, a toxoplasmose tem sido relacionada como uma das mais importantes manifestações para esses pacientes, como resultado muito provável de uma reativação de infecção latente¹¹. Assim sendo, e preocupados em conhecer a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* entre pacientes acometidos da AIDS no Estado de São Paulo, realizamos estudo com tal finalidade em amostra constituída por 450 pacientes com pesquisa positiva para anticorpos anti-HIV.

Os resultados observados na tabela 3 revelaram uma prevalência de anticorpos Igtotal anti-*T. gondii* no soro e LCR de 69,1% e 47,3%, respectivamente. Esses valores são bastante semelhantes aos estabelecidos em outros estudos para diferentes grupos populacionais de diferentes áreas do Brasil, ou mesmo aos verificados para outros países^{7,2,3,5,6,7,8,11,16,18}. Tais resultados

sugerem que, a princípio, a prevalência de anticorpos Igtotal anti-*T. gondii* na população, com pesquisa positiva para HIV, não deve diferir do valor desta prevalência em relação à população em geral.

Embora parcela considerável dos pacientes examinados mostrasse quadro clínico compatível com toxoplasmose, apenas 2,8% das amostras investigadas para IgM específico anti-*T. gondii* foram positivas. Tal observação pode ser explicada pela deficiência manifestada por pacientes de AIDS em produzir IgM, ou devido à própria reatificação de infecção crônica. Nos E.U.A., anticorpos IgM anti-*T. gondii* são raramente demonstráveis¹¹. Na França, entretanto, dos pacientes com AIDS atendidos no Hospital Claude Bernard, 20% têm IgM positivo¹¹.

Deve-se ressaltar a concomitância de positividade em amostras de soro sanguíneo e LCR de pacientes com quadro clínico compatível com toxoplasmose. Da mesma forma, em pacientes cujas amostras de soro sanguíneo mostraram títulos de anticorpos Igtotal anti-*T. gondii* ≥ 1.024 , a concomitância de positividade no LCR apresentou um crescimento diretamente proporcional à fase clínica da AIDS.

Ainda que os resultados obtidos pela investigação de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes de AIDS tenham apenas um valor de apoio, uma vez que as pesquisas de IgM usualmente revelam sua ausência, em recente estudo, POTASMAN et alii, 1988¹⁴, conseguiram mostrar que, em alguns destes pacientes com AIDS e encefalite toxoplásmica, os anticorpos anti-*T. gondii* podem ser produzidos no Sistema Nervoso Central, o que possibilitaria usar tal conhecimento com fins diagnósticos para encefalite toxoplásmica.

Para finalizar, os autores acreditam que os valores observados no presente estudo para anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes portadores da AIDS acabam por indicar expectativas sombrias no que tange ao aparecimento de alterações nervosas devido a tal protozoário, a exemplo do que se verifica em outros países onde estimativas recentes apontam que cerca de 30% dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana desenvolvem toxoplasmose cerebral⁵. Novos estudos devem ser desenvolvidos, objetivando o estabelecimento de metodologia que permita quantificar o risco de pacientes com AIDS virem a desenvolver encefalite toxoplásmica. Isto permitirá estabelecer propostas profiláticas racionais para combate ao *Toxoplasma gondii*.

NASCIMENTO, C.B.; TOLEZANO, J.E.; KAWARABAYASHI, M.; COELHO, J.R.; RAYMUNDO, M.L.; LÍRIO, V.S.; UEDA, M.; SOUZA, A.M.C.; FERRARI, L. & PINTO, W.P. – Immunofluorescence tests for toxoplasmosis in patients with AIDS. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):101-106, 1989.

ABSTRACT: In this paper, we present the experience with total immunoglobulin and IgM immunofluorescence tests for toxoplasmosis in 1,050 serum or cerebrospinal fluid samples from 450 patients of São Paulo, Brazil, with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The antibody anti-*Toxoplasma gondii* prevalence among patients positive to anti-HIV antibody was studied. The results showed 69.1% and 47.3% total immunoglobulin antibodies to *Toxoplasma gondii* in serum and cerebrospinal fluid; 2.8% serum samples revealed IgM antibodies to *T. gondii*. Patients with clinical features of toxoplasmosis had total immunoglobulin antibodies in 61.2% cerebrospinal samples examined. From patients who had titer of total immunoglobulin antibodies to *T. gondii* in serum samples $\geq 1,024$ we found 80.0% concomitant positivity in cerebrospinal fluid samples.

DESCRIPTORS: toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); AIDS, prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, F.G. – Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 12(2): 105-11, 1970.
2. BARUZZI, R.G. – Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology: serology survey among the indians of the upper Xingu River, Central Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 12(2): 93-104, 1970.
3. COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; CAMILLO-COURA, L.; MARZOCHI, M.C.A. & AMEN-DOEIRA, M.R.R. – Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6.079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro, realizadas durante os anos de 1971 a 1977. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 23(2):48-56, 1981.
4. DUBEY, J.P. – *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J.R., ed. – *Parasitic protozoa*. London, Academic Press, 1977. v.3, p. 101-237.
5. GOMES, U.A.; TERUEL, J.R.; FERRIOLI FILHO, F. & NOGUEIRA, J.L. – Estudo comparativo das freqüências de infecção por *Toxoplasma gondii*, zona urbana e rural. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 17(6): 355-60, 1975.
6. LAMB, G.A. & FELDMAN, H.A. – A nationwide serum survey of Brazilian military recruits, 1964. III. *Toxoplasma* dye test antibodies. *Am. J. Epidemiol.*, 87(2): 323-8, 1968.
7. LESER, P.G.; CAMARGO, M.E. & BARUZZI, R.G. – Toxoplasmosis serologic tests in Brazilians indians (krenakorone) of recent contact with civilized man. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 19(4): 232-6, 1977.
8. LEVY, R.M.; BREDESEN, D.E. & ROSENBLUM, M.L. – Neurological manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): experience at UCSF and review of the literature. *J. Neurosurg.*, 62(1): 475-95, 1985.
9. LUFT, B.J.; BROOKS, R.G.; CONLEY, F.K.; McCABE, R.E. & REMINGTON, J.S. – Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *JAMA*, 252(7): 913-7, 1984.
10. LUFT, B.J.; CONLEY, F.; REMINGTON, J.S. – Outbreak of central nervous system toxoplasmosis in Western Europe and North America. *Lancet*, I(8328): 781-4, 1983.
11. LUFT, B. & REMINGTON, J.S. – Toxoplasmic encephalitis. *J. infect. Dis.*, 157(1): 1-6, 1988.
12. NAVIA, B.A.; PETITO, C.K.; GOLD, J.W.M.; CHO, E.S.; JORDAN, B.D. & PRICE, R.W. – Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Ann. Neurol.*, 19(3): 224-38, 1986.
13. NERY GUIMARÃES, F. – Toxoplasmose humana meningoencefalomielite toxoplásmica; ocorrência em adulto e em recém-nascido. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 38(3): 257-320, 1943.
14. POTASMAN, I.; RESNICK, L.; LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S. – Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann. intern. Med.*, 108(1): 49-51, 1988.
15. SNIDER, W.D.; SIMPSON, D.M.; NIELSEN, S.; GOLD, J.W.M.; METROKA, C.E. & POSNER, J.B. – Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann. Neurol.*, 14(4): 403-18, 1983.

NASCIMENTO, C.B.; TOLEZANO, J.E.; KAWARABAYASHI, M.; COELHO, J.R.; RAYMUNDO, M.L.; LÍRIO, V.S.; UEDA, M.; SOUZA, A.M.C.; FERRARI, L. & PINTO, W.P. – Reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **49**(1):101-106, 1989.

16. WALLS, K.W. & KAGAN, I.G. – Studies on the prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii*. 2. Brazil. *A.J. Epidemiol.*, **86**(2): 305-13, 1967.
17. WEISS, L.M.; UDEM, S.A.; TANOWITZ, H. & WITTNER, M. – Western Blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and Toxoplasma encephalitis: antigenic diversity among *Toxoplasma* strains. *J. infect. Dis.*, **157**(1): 7-12, 1988.
18. WELCH, P.C.; MASUR, H.; JONES, T. & REMINGTON, J.S. – Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *J. infect. Dis.*, **142**(2): 256-64, 1980.
19. WONG, B.; GOLD, J.W.M.; BROWN, A.E.; LANGE, M.; FRIED, R.; GRIECO, M.; MILDVAN, D.; GIRON, J.; TAPPER, M.L.; LERNER, C.N. & ARMSTRONG, D. – Central-nervous-system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. *Ann. intern. Med.*, **100**(1): 36-42, 1984.

Recebido para publicação em 10 de março de 1989.

SOROTIPOS DE *SERRATIA MARCESCENS* EM INFECÇÕES HUMANAS *

Kinue IRINO**
Tânia Mara Ibelli VAZ**
Ilka Maria LANDGRAF**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Vera Simonsen Dias VIEIRA**

RIALA6/667

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; LANDGRAF, I.M.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D.
– Sorotipos de *Serratia marcescens* em infecções humanas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):
107-115, 1989.

RESUMO: 290 cepas de *Serratia marcescens*, a grande maioria isolada de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de sangue, foram classificadas em 46 sorotipos de acordo com a classificação sorológica proposta por Le Minor e Pigache. Foram identificados 25 sorotipos entre as 145 cepas isoladas de LCR e os sorotipos 06,14:H12 e 06,14:H4 foram os mais frequentes, correspondendo a mais de 70% das cepas. Das 102 cepas isoladas de sangue, 65% dos sorotipos pertenciam aos sorotipos 06,14:H12, 06,14:H4 e 01:H7, sendo que este último foi responsabilizado por um surto de infecção hospitalar atingindo crianças, na sua maioria menores de 1 ano. Foi verificado que mais de 73%, 70% e 80% de cepas isoladas respectivamente de LCR, sangue e fezes, eram provenientes de crianças de 0 a 5 anos. Os sorotipos 06,14:H12 e 06,14:H4 também foram os predominantes entre os 12 sorotipos identificados nas amostras isoladas de fezes, sugerindo uma possível fonte de infecção, principalmente em berçários.

DESCRITORES: *Serratia marcescens*, sorotipos; infecção (humana) por *Serratia marcescens*.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tornaram-se cada vez mais frequentes os relatos sobre as infecções causadas por bactérias do gênero *Serratia*, consideradas raras até a década de 50.

A *Serratia marcescens*, ubiqüitária, constitui a única espécie do gênero^{7,8,11} verdadeiramente nosocomial^{15,9}, representando mais de 90% das espécies isoladas de infecções humanas. Considerada como uma das enterobactérias mais resistentes aos agentes físicos e químicos⁵, a sua persistência em equipamentos e a sua capacidade de multiplicação em soluções utilizadas em ambientes hospitalares têm sido as causas mais frequentes de surtos de infecções por estes microrganismos^{4,19}.

Para o estudo da epidemiologia dessas infecções, diferentes sistemas de marcadores foram desenvolvidos. Entre eles, a sorotipagem, através da caracterização dos antígenos somáticos e flagelares, já vem sendo utilizada na diferenciação de sorotipos dentro desta espécie.

O esquema antigênico atual de *Serratia marcescens* consiste de 23 antígenos somáticos e 26 antígenos flagelares^{14,17}, possibilitando a classificação em mais de 100 sorotipos.

Diante do grande número de isolamentos de *Serratia marcescens*, principalmente a partir de sangue e de líquido cefalorraquidiano^{1,13}, o objetivo deste trabalho foi determinar os sorotipos de cepas isoladas no período 1974-1987, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, possibilitando assim maiores conhecimentos sobre a epidemiologia destas infecções em nosso meio.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de Serratia marcescens estudadas

Entre as cepas isoladas no período 1974-1987 foram estudadas 290, sendo 145 de líquido cefalorraquidiano, 102 de sangue, 38 de fezes, 2 de secreções, 1 de necrópsia de pulmão, 1 de urina e 1 de origem não determinada.

Métodos de identificação bioquímica

Todas as cepas com diagnóstico presuntivo de pertencerem ao gênero *Serratia*, foram submetidas à identificação bioquímica segundo os métodos descritos por EWING² no "Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae".

Métodos de identificação sorológica

*Preparo de antissoros somáticos*¹⁶ – Para o preparo dos antígenos somáticos, as cepas-padrões de *Serratia marcescens*, recebidas do Instituto Pasteur de Paris, foram cultivadas em ágar comum por 18-24 horas, a 30°C, em estufa. As suspensões bacterianas, preparadas a partir de colônias lisas, foram aquecidas por 2 horas, a 100°C e, a seguir, diluídas para conter aproximadamente 2×10^9 bactérias/ml. A imunização dos coelhos albinos, com peso superior a 2,5 kg foi iniciada com uma inoculação subcutânea de 0,5 ml, seguida de 4 inoculações endovenosas de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 ml, com intervalos de 4 dias entre as inoculações. Sete dias após a última inoculação, os animais foram sangrados, os anti-soros separados e, após a adição de mertiolate na concentração final de 1:10.000, foram estocados a +4°C. Os anti-soros foram titulados em lâmina; conhecendo-se as reações cruzadas existentes entre os antígenos, foram preparados sete anti-soros polivalentes somáticos com as seguintes composições:

Polivalente I	02+03+04+021
Polivalente II	05+08+013+019
Polivalente III	06+012+014+CO/12, 13, 14
Polivalente IV	07+011+016+020
Polivalente V	01+09+015+017
Polivalente VI	010+018
Polivalente VII	022+023

Os 23 antissoros somáticos monovalentes (01 a 023) foram preparados eliminando-se as reações cruzadas por absorção.

Preparo dos antissoros flagelares. No preparo dos antissoros flagelares, as cepas-padrões foram ativadas através de várias passagens em tubo em U, contendo ágar semi-sólido a 0,3%. Quando as culturas apresentaram uma motilidade bem desenvolvida, foram semeadas em placas de Petri contendo ágar semi-sólido a 0,7%.

e incubadas a 30°C, por 18-24 horas em estufa. As culturas bacterianas foram coletadas em solução fisiológica formolada a 0,5% e agitadas em frascos contendo pérolas de vidro para separar os flagelos do corpo bacteriano. A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos, obtendo-se assim um sobrenadante rico em flagelos. Após o controle de esterilidade, os antígenos flagelares (sobrenadante límpido) foram inoculados em coelhos albinos com peso superior a 2,5 kg. Esquema de imunização foi iniciado com uma inoculação subcutânea de 0,5 ml do antígeno, seguido de 4 injeções endovenosas de 0,5, 1, 2 e 4 ml, com intervalos de 4 dias entre as inoculações. Sete dias após a última inoculação, os animais foram sangrados e os soros separados e conservados a +4°C. Após a titulação em lâmina e conhecendo-se as reações cruzadas existentes entre os antígenos flagelares, foram preparados 6 antissoros polivalentes com as seguintes composições.

Polivalente I	H1+H2+H14+H19
Polivalente II	H3+H8+H9+H10
Polivalente III	H4+H7+H12+H20
Polivalente IV	H5+H6+H11+H13
Polivalente V	H15+H17+H21+H22
Polivalente VI	H16+H18+H23+H24+ H25+H26

Os 26 antissoros flagelares monovalentes (H1 a H26) foram preparados eliminando as reações cruzadas através de absorções.

Determinação dos antígenos somáticos – Dada a existência de antígenos de superfície que pudessem impedir a aglutinação somática, as cepas foram cultivadas em caldo comum, sob agitação por 5 horas, a 37°C e, a seguir, aquecidas a 100°C, por 30 minutos e centrifugados a 5.000 rpm, durante 20 minutos. O sedimento bacteriano foi inicialmente testado com os antissoros polivalentes somáticos, em lâmina e, a seguir, com os antissoros específicos correspondentes ao polivalente que apresentou a aglutinação.

Determinação dos antígenos flagelares pela técnica de imobilização^{15,20,27} – Os antígenos flagelares foram determinados após uma série de passagens em meio semi-sólido, a fim de ativar a motilidade das cepas. A seguir foram semeadas em tubos contendo meio manita-movimento¹⁵, acrescidos de um dos antissoros polivalentes flagelares. A imobilização das cepas com um dos antissoros foi verificada pelo crescimento somente junto à picada de semeadura, enquanto que o crescimento difuso em toda extensão do tubo, idêntico ao crescimento no tubo controle, foi considerado como ausência de imobilização. A

seguir, para a determinação dos antígenos flagelares, as cepas foram semeadas em tubos contendo o mesmo meio acrescido de um dos antissoros monovalentes correspondentes ao soro polivalente que imobilizou a cepa em estudo.

RESULTADOS

Foram identificados 46 sorotipos entre as 290 cepas estudadas. Estes sorotipos estão relacionados, quanto à origem do material, na tabela 1.

TABELA 1

Sorotipos de Serratia marcescens

Sorotipos	Material						Total
	LCR	Sangue	Fezes	Urina	Secr.	Outros	
01:H7	—	18	—	—	—	—	18
02:H1	—	2	—	—	—	—	2
03:H2	—	—	1	—	—	—	1
03:H4	2	3	—	—	—	—	5
04:H1	1	—	1	—	—	—	2
04:H2	—	1	1	—	—	—	2
04:H4	2	3	1	—	—	—	6
04:H7	—	—	1	—	—	—	1
04:H12	5	10	—	—	—	—	15
05:H1	—	1	—	—	—	—	1
05:H2	1	—	1	—	—	—	2
05:H5	—	1	—	—	—	—	1
05:H19	1	1	—	1	—	—	3
05:H12	1	1	—	—	—	—	2
06,14:H2	—	1	—	—	—	—	1
06,14:H3	2	—	—	—	1	—	3
06,14:H4	27	21	22	—	1	—	71
06,14:H5	1	—	—	—	—	—	1
06,14:H10	1	1	—	—	—	—	2
06,14:H12	81	18	5	—	—	1	105
06,14:H20	1	—	1	—	—	—	2
06,14:H-	4	3	2	—	—	1	10
07:H4	—	1	—	—	—	—	1
07:H23	3	—	—	—	—	—	3
09:H17	1	—	—	—	—	—	1
09:H19	1	—	—	—	—	—	1
010:H9	—	1	—	—	—	—	1
010:H11	1	—	—	—	—	—	1
010:H15	—	1	—	—	—	—	1
010:H19	—	1	—	—	—	—	1
010:H-	—	—	1	—	—	—	1
012:H5	—	1	—	—	—	—	1
012:H11	2	3	—	—	—	—	5
013:H17	2	1	—	—	—	—	3
013:H19	—	1	—	—	—	—	1
015:H20	—	1	—	—	—	—	1
015:H23	1	—	—	—	—	—	1
016:H19	1	—	—	—	—	—	1
016:H25	2	—	—	—	—	—	2
016:H-	—	—	1	—	—	—	1
018:H18	—	—	1	—	—	—	1
019:H4	—	1	—	—	—	—	1
CO/12, 13, 14:H11	—	2	—	—	—	—	2
CO/12, 13,14:H12	1	—	—	—	—	—	1
CO/12, 13, 14:H-	—	1	—	—	—	—	1
CO/12, 13, 14+06,14:H12	—	1	—	—	—	—	1
Total	145	102	38	1	2	2	290

TABELA 2

Distribuição, por faixa etária, dos sorotipos de Serratia marcescens isolados de líquido cefalorraquidiano

Sorotipos	Faixa etária												Total	
	0-3m	3-6m	6-9m	9-12m	1-5a	5-10a	10-15a	15-20a	20-30a	30-40a	>40a	I.D.	Nº	%
06,14:H12	45	10	2	-	5	2	1	1	4	-	-	11	81	55,9
06,14:H4	11	4	1	1	3	-	1	-	-	1	-	5	27	18,6
04:H12	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	5	3,4
07:H23	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	2,1
Outros 21 sorotipos	10	1	1	3	5	1	1	-	-	2	-	5	29	20,0
Total	68	16	5	4	13	3	3	1	4	3	-	25	145	100,0

m = meses.

a = anos.

I.D. = idade desconhecida.

TABELA 3

Distribuição, por faixa etária, dos sorotipos de Serratia marcescens isolados de sangue

Sorotipos	Faixa etária											Total		
	0-3m	3-6m	6-9m	9-12m	1-5a	5-10a	10-15a	15-20a	20-30a	30-40a	>40a	I.D.	Nº	%
06,14:H4	5	2	3	-	3	1	1	1	-	1	1	3	21	20,6
06,14:H12	10	2	-	1	-	1	-	-	3	1	-	-	18	17,6
01:H7	6	4	1	1	5	1	-	-	-	-	-	-	18	17,6
04:H12	5	2	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	10	9,8
Outros 26 sorotipos	11	2	3	-	4	1	1	2	-	2	6	3	35	34,3
Total	37	12	8	2	12	4	2	3	4	4	7	7	102	100,0

m = meses.

a = anos.

I.D. = idade desconhecida.

TABELA 4

Distribuição, por faixa etária, dos sorotipos de *Serratia marcescens* isolados de fezes

Sorotipos	Faixa etária											Total		
	0-3m	3-6m	6-9m	9-12m	1-5a	5-10a	10-15a	15-20a	20-30a	30-40a	>40a	I.D.	Nº	%
06,14:H4	12	5	1	1	1	-	-	-	-	-	-	2	22	57,9
06,14:H12	3	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	5	13,2
Outros 10 sorotipos	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	11	28,9
Total	23	5	2	1	2	-	-	-	-	-	-	5	38	100,0

m = meses.

a = anos.

I.D. = idade desconhecida.

Verificamos que os sorotipos mais freqüentes foram 06,14:H12 e 06,14:H4, como tem sido observado por diversos autores^{1,6,18,19,20,21}.

Entre as 145 cepas isoladas de líquido cefalorraquidiano, estes dois sorotipos (06,14:H12 e 06,14:H4) corresponderam a mais de 70% dos 25 sorotipos identificados.

Também, entre os 30 sorotipos identificados entre as 102 cepas isoladas de sangue, os dois sorotipos acima descritos e o sorotipo 01:H7 foram responsáveis por 65% de todos os sorotipos.

É interessante observar que entre os 12 sorotipos identificados entre as amostras isoladas de fezes de crianças, os sorotipos mais freqüentes foram também 06,14:H4, com 57,9% e 06,14:H12 com 13,0%.

Nas tabelas 2, 3 e 4 estão relacionados os sorotipos mais freqüentes isolados de líquido cefalorraquidiano, sangue e fezes, quanto à sua distribuição por faixa etária. Verificamos que das amostras isoladas de líquido cefalorraquidiano 73% foram isoladas de crianças de 0 a 5 anos de idade. Quanto aos sorotipos isolados de sangue, aproximadamente 70% dos 30 sorotipos foram isolados também de crianças na faixa etária de 0 a 5 anos. Mais de 80% dos 12 sorotipos, identificados entre as amostras isoladas de fezes, eram também de crianças até 5 anos, sendo 60,5% em crianças de 0 a 3 meses de idade (tabela 4).

DISCUSSÃO

Considerada por muito tempo como uma enterobactéria saprófita, a *Serratia marcescens* vem sendo relatada desde a década de 60 como uma das causas mais freqüentes de infecções de origem hospitalar.

Fatores que predis põem um paciente hospitalizado à infecção por *Serratia marcescens* são aqueles que favorecem a implantação de qualquer patógeno oportunista. Mais de 90% das infecções causadas por estes microrganismos são representadas por infecções do trato urinário, respiratório, e por septicemias^{23,30} conseqüentes às infecções primárias dos tratos urinário e respiratório e da cateterização endovenosa.

O papel cada vez mais importante que a *Serratia marcescens* vem assumindo, nas infecções nosocomiais, levou ao desenvolvimento de diferentes sistemas de marcadores epidemiológicos com o objetivo de estudar o seu comportamento. Surto de infecções causados por *Serratia marcescens* puderam ser estudados quanto à fonte de infecção e modos de transmissão, utilizando os sorotipos como marcadores epidemiológicos. Determinados sorotipos parecem estar envolvidos

com maior freqüência nas infecções causadas por estas bactérias. Dentre os sorotipos atualmente conhecidos, cepas pertencentes aos sorotipos 06,14:H12, 06,14:H4 e 01:H7 têm sido isolados de surtos ocorridos nos Estados Unidos^{24,29}. O sorotipo 06,14:H12 parece ser ubiqüitário, e em algumas investigações tem representado até 50% de todos os sorotipos isolados¹⁹.

Entre as amostras estudadas neste trabalho, na maioria originária de líquido cefalorraquidiano e de sangue, os sorotipos 06,14:H12, 06,14:H4 e 01:H7 também foram os mais freqüentes, tendo este último sido responsabilizado por um surto de septicemia ocorrido em um hospital do Município de São Paulo, em 1980, atingindo na sua grande maioria crianças menores de 1 ano.

Apenas 5 sorotipos (06,14:H12, 06,14:H4, 01:H7, 04:H12 e 06,14:H-) representaram mais de 70% das cepas estudadas. O sorotipo 06,14:H12 representou 36% de todos os sorotipos. O fato de ser este sorotipo o mais freqüente, tanto em infecções esporádicas como em surtos epidêmicos, pode sugerir uma virulência maior entre as cepas pertencentes a este sorotipo¹⁹.

A presença de *Serratia marcescens* no trato intestinal de adultos hospitalizados parece ser rara²⁹; entretanto, GRIMONT & GRIMONT⁹, utilizando meio seletivo, verificaram que, nas enfermarias contaminadas, 21% dos pacientes apresentavam uma colonização intestinal, em contraste com 3% de pacientes de outras áreas do mesmo hospital.

Entre as cepas isoladas de fezes, verificamos que dois sorotipos 06,14:H4 e 06,14:H12, representaram, respectivamente, 57% e 13% dos 12 sorotipos identificados. Embora não haja evidências quanto à sua patogenicidade no intestino, a presença destes dois sorotipos, que representaram os mais comumente isolados de infecções sistêmicas, principalmente de crianças até 5 anos de idade, pode representar uma possível fonte de infecção, como tem sido relatado em surtos ocorridos em berçários¹⁹.

A identificação da grande maioria dos sorotipos constitui-se em eventos raros; entretanto, é importante ressaltar que qualquer sorotipo poderá eventualmente vir a ser a causa de graves infecções para um hospedeiro com as defesas naturais debilitadas. A disseminação, favorecida pelas inadequadas condições de higiene hospitalar, e a multirresistência às drogas apresentadas por estes patógenos, selecionados pelo uso excessivo de agentes antibacterianos, poderão ser as causas do difícil controle das infecções causadas por estes microrganismos.

Estudos sobre a classificação sorológica de cepas de *Serratia marcescens* auxilia no

conhecimento de sua epidemiologia e uma completa caracterização de cepas poderá ser obtida com a utilização conjunta de outros marcadores epidemiológicos^{3,6,10,12,16,22,25,26,29}.

Agradecimentos

À Dra. S. Le Minor, do Instituto Pasteur, Paris, pelo envio de cepas padrões de *S. marcescens*.

RIALA6/667

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; LANDGRAF, I.M.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. – Serotypes of *Serratia marcescens* from human infections. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):107-115, 1989.

ABSTRACT: 290 *Serratia marcescens* strains, most of them isolated from cerebro spinal fluid (CSF) and blood cultures, were classified into 46 serotypes according to the serological identifications methods described by Le Minor and Pigache. Of 25 serotypes disclosed among 145 isolates from CSF, 06, 14:H12 and 06,14:H4 were the predominant types, and accounted for over 70% of all the strains typed. Among blood isolates 65% of 102 strains fell into three serotypes, 06,14:H12 06,14:H4 and 01:H7. In 1980, the serotype 01:H7 caused a nosocomial infection in an infantile hospital in São Paulo Municipality, involving children less than 1 year old. It has been verified that more than 73%, 70% and 80% of all the strains isolated from CSF, blood, and stool, respectively, were from children between 0-5 years of age. Of 12 serotypes disclosed among 38 strains isolated from stool, the 2 most frequently isolated serotypes from LCR and blood cultures, 06,14:H12 and 06,14:H4, were also the predominant types suggesting a potential source for *Serratia marcescens* outbreaks in nurseries.

DESCRIPTORS: *Serratia marcescens*, serotypes; infection (human) by *Serratia marcescens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDILEONE, M.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.N.; VIEIRA, V.S.D. & PESSOA, G.V.A. – Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):115-23, 1984.
2. EWING, W.H. – *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York, Elsevier Science, 1986. p. 432-41.
3. FARMER III, J.J. – Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*: typing by bacteriocin sensitivity. *Appl. Microbiol.*, 23:226-231, 1972.
4. FARMER III, J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN, F.W.; PRESLEY, D.B.; BODEY, G.P.; NEGUT, M. & BOBO, R.A. – Detection of *Serratia* outbreaks in hospital. *Lancet*, 2:455-9, 1976.
5. GRIMONT, P.A.D. – Les *Serratia* et l'infection dans les collectivités. *Gaz. méd. France*, 87(30): 3867-77, 1980.
6. GRIMONT, P.A.D.; & GRIMONT, F. – Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *J. clin. Microbiol.*, 8(1): 73-83, 1978.
7. GRIMONT, P.A.D. & GRIMONT, F. – Genus VIII *Serratia* Bizio 1823, 288. In: *BERGEY'S manual of systematic bacteriology*. Baltimore, William & Wilkins, c1984. p. 477-484.
8. GRIMONT, P.A.D. & GRIMONT, F. – Taxonomie des *Serratia*. *INSERM*, 114:129-142, 1983.
9. GRIMONT, P.A.D. & GRIMONT, F. – The genus *Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 32:221-48, 1978.
10. GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; LE MINOR, S.; DAVIS, B. & PIGACHE, F. – Compatible results obtained from biotyping and serotyping in *Serratia marcescens*. *J. clin. Microbiol.*, 10(4):425-432, 1979.
11. GRIMONT, P.A.D.; IRINO, K. & GRIMONT, F. – The *Serratia liquefaciens* - *S. proteamaculans* - *S. grimesii* complex: DNA relatedness. *Curr. Microbiol.*, 7:63-8, 1982.
12. IRINO, K.; GRIMONT, F.; CASIN, I.; GRIMONT, P.A.D. & The Brazilian Purpuric Fever Study Group. – rRNA generestriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius strains associated with Brazilian Purpuric Fever. *J. clin. Microbiol.*, 26(8):1535-8, 1988.
13. LANDGRAF, I.M.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; VIEIRA, M.F.P. & MELES, C.E.A. – Enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* isoladas de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):103-7, 1987.
14. Le MINOR, S.; BENET, F. & MARTIN, L. – Nouveaux facteurs antigéniques 0 (023) et II de *Serratia marcescens*. *Ann. Microbiol.*, 134B:477-9, 1983.
15. Le MINOR, S. & PIGACHE, F. – Étude antigénique de souches de *Serratia marcescens* isolées en France. I - Antigènes II: individualisation de six nouveaux facteurs II. *Ann. Microbiol.*, 128B:207-14, 1977.

16. Le MINOR, S. & PIGACHE, F. – Étude antigénique de souches de *Serratia marcescens* isolées en France. II - Caractérisation des antigènes O et individualisation de 5 nouveaux facteurs, fréquence des sérotypes et désignation des nouveaux facteurs H. *Ann. Microbiol.*, **129B**: 407-32, 1978.
17. Le MINOR, S. & SAVAGEOT-PIGACHE, F. – Nouveaux facteurs antigéniques II (H21-H25) et (O21) de *Serratia marcescens*: subdivision des facteurs O5, O10, O16. *Ann. Microbiol.*, **132A**: 239-52, 1981.
18. PITT, T.L. – State of the art: typing of *Serratia marcescens*. *J. hosp. Infect.*, **3**:9-14, 1982.
19. PITT, T.L. & ERDMAN, Y.J. – Serological typing of *Serratia marcescens*. *Meth. Microbiol.*, **15**:173-211, 1984.
20. PITT, T.L.; ERDMAN, Y.J. & BUCHER, C. – The epidemiological type identification of *Serratia marcescens* from outbreaks of infection in hospitals. *J. Hyg., Camb.*, **84**:269-283, 1980.
21. PLATT, D.J. & SOMMERVILLE, J.S. – *Serratia* species isolated from patients in a general hospital. *J. hosp. Infect.*, **2**:341-8, 1981.
22. RUBIN, S.J.; BROCK, S.; CHAMBERLAND, M. & LYONS, R.W. – Combined serotyping and biotyping of *Serratia marcescens*. *J. clin. Microbiol.*, **3**:582-5, 1976.
23. SCHABERG, D.R.; ALFORD, R.H.; ANDERSON, R.; FARMER III, J.J.; MELLY, M.A. & SCHAFFNER, W. – An outbreak of nosocomial infection due to multiply resistant *Serratia marcescens*: evidence of interhospital spread. *J. infect. Dis.*, **134**(2): 181-8, 1976.
24. STENDERUP, A.; FAEGERMAN, O.; INGERSLEV, M. – *Serratia marcescens* infections in premature infants. *Acta. pathol. microbiol. Scand.*, **68**:157-60, 1966.
25. STULL, T.L.; LIPUMA, J.J. & EDLIND, T.D. – A Broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J. infect. Dis.*, **157**:280-6, 1988.
26. TRAUB, W.H. – Bacteriocin typing of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Meth. Microbiol.*, **11**:223-42, 1978.
27. TRAUB, W. & KLEBER, I. – Serotyping of *Serratia marcescens*: Evaluation of Le Minor's H - Immobilization test and description of three new flagellar H antigens. *J. clin. Microbiol.*, **5**(2):115-21, 1977.
28. Von GRAEVENITZ, A. – The role of opportunistic bacteria in human disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**:447-71.
29. Von GRAEVENITZ, A. & RUBIN, S.J. – The Genus *Serratia*. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1980. p. 196.
30. 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**(2):345-52, 1970.

Recebido para publicação em 10 de março de 1989.

NOTÍCIAS

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS (CONFEN/UNFDAC)

O Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina está consolidando um *Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas*, em convênio com o *Conselho Federal de Entorpecentes* (CONFEN) e com as *United Nations fund for Drug Abuse Control* (UNFDAC).

Este Centro reúne, e coloca à disposição do público, dados relativos ao consumo, prevenção, tratamento e repressão ao uso e tráfico de drogas psicotrópicas no Brasil, constituindo-se na primeira iniciativa deste gênero no País.

Um dos serviços que já se encontra em pleno funcionamento é o *Banco de Dados da Produção Científica Brasileira sobre o Abuso de Drogas Psicotrópicas*. O Banco contém quase 1000 artigos científicos publicados no Brasil, desde o relato clínico da intoxicação de escravos pela planta alucinógena conhecida por "trombeteira", até levantamentos epidemiológicos sobre o uso de bebidas alcoólicas por crianças. As listagens podem ser requisitadas por *ano de publicação, autor, estado, revista, droga ou grupo de drogas, população onde o dado foi colhido, conteúdo específico*. Através da delimitação destes itens as listagens poderão ser bem específicas ou bem genéricas. A partir da listagem recebida, caso haja interesse, poderão ser obtidas fotocópias dos trabalhos.

As listagens deverão ser solicitadas por carta ao Banco de Dados - Departamento de Psicobiologia/Escola Paulista de Medicina - Rua Botucatu, 862 - CEP 04023 - São Paulo/SP.

Longe de ser completo, pois um grande número de trabalhos científicos brasileiros foi publicado em revistas não indexadas, o Banco de Dados aceita e agradece as contribuições que forem feitas (basta enviar cópia do trabalho para o endereço acima.)

ÍNDICE DE AUTOR / *AUTHOR INDEX*

- ALVES, H.I., 57
ALVES, V.A.F., 75
ALVES, W., 57
ANTUNES, J.L.F., 69
ARAÚJO, M.F.L., 85
ATUI, M.B., 11
AURICCHIO, M.T., 5, 45
AVELAR, M.C.Q., 27
BALANCO, J.M.F., 85
BARRETTO, H.H.C., 27
BATISTIC, M.A., 5, 45
BOSCARDIN, N.B., 61
BRANDILEONE, M.C.C., 107
CARDOSO, D.P.A., 27
CHICOUREL, E.L., 19
CHIEFFI, P.P., 85, 93
COELHO, J.R., 101
CORREA, F.M.A., 69
D' ANDRADE, O.M., 85
DIAS, N.A., 51
DIAS, R.M.D.S., 69
DUARTE, M., 19
FARACO, M.L., 61
FERRARI, L., 101
FONSECA, I.E.M., 57
FUKUMOTO, C.J., 61
FUZIHARA, T.O., 69
GUILHERME, C.S., 85
HOPPEN, V.R., 5, 45
IRINO, K., 107
KAWARABAYASHI, M., 101
LANDGRAF, I.M., 61, 107
LIRIO, V.S., 101
MANGINI, A.C.S., 69
MARTINS, M.S., 51
MELLES, C.E.A., 61
MILANEZ, T.V., 41
NASCIMENTO, C.B., 101
NOGUEIRA, M.H., 27
NOVO, O.F., 57
NUNES, E.V., 85
OLIVEIRA, M.I., 69
PEDROSO, M.O., 41
PEREIRA, L.E., 85
PESTANA, C.B., 75
PINTO, W.P., 101
RAYMUNDO, M.L., 101
RODAS, M.A.B., 19
SABINO, M., 41
SAKUMA, A.M., 81
SAKUMA, H., 19
SANTOS, M.C., 35
SARUWTARI, J.H., 19
SCORSAFAVA, M.A., 81
SILVEIRA, N.V.V., 19
SIQUEIRA, S.A.C., 75
SOUZA, A.M.C., 101
TIGLEA, P., 81
TOLEZANO, J.E., 85, 101
TORRES, D.M.A.G.V., 69
UEDA, M., 101
VALENTIM, A.M., 85
VAZ, T.M.I., 107
VIEIRA, V.S.D., 107
WALDMAN, E.A. A., 93
WESTPHALEN, S.R., 85
YABIKU, E.Y., 51
YAMASHITA, I.Y., 45
ZAMBONI, C.Q., 11, 35
ZENEBON, O., 81
ZORZETTO, M.A.P., 41

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Aditivos para alimentos
 arsênio em, determinação
 métodos, estudo comparativo, 51
- Aflatoxina
 em amendoim, determinação
 cromatografia em camada delgada, 41
 em produtos de amendoim, determinação
 cromatografia em camada delgada, 41
- AIDS
 veja Síndrome de imunodeficiência adquirida
- Alho (*Allium sativum*)
 extrato hidroalcoólico de, identificação,
 óleo essencial de, identificação, 5
- Amendoim
 aflatoxina em, determinação, 41
- Amendoim, produtos
 aflatoxina em, determinação, 41
- Arsênio
 em aditivos para alimentos,
 determinação, 51
- Banana (*Musa sp.*)
 tanino da, em produtos industrializados
 de banana, detecção, 35
- Cádmio, traços
 em hortaliças, determinação
 espectrofotometria de absorção
 atômica, 81
- Cânulas (borracha, plástico)
 esterilização com óxido de etileno, 27
- Categute
 esterilização pelo raio gama
 degradação da proteína, 57
 esterilização química, contrd e, 57
- Chá (plantas medicinais)
 identificação das espécies, 45
 matéria mineral estranha em, determinação
 método das cinzas insolúveis em ácido, 45
- Chumbo, traços
 em hortaliças, determinação
 espectrofotometria de absorção
 atômica, 81
- Enteroparasitoses
 epidemiologia
 São Paulo, Brasil, 93
 programas de saúde, 93
- Esterilização
 de cânulas (borracha, plástico)
 com óxido de etileno, 27
 de categute
 pelo raio gama, 57
 de seringas (plástico)
 com óxido de etileno, 27
- Giardíase
 correlação com grupo sanguíneo
 em São Caetano do Sul, São Paulo,
 Brasil, 69
- Grupos sanguíneos (sistema ABO)
 correlação com giardíase, 69
- Hortaliças
 cádmio, chumbo, zinco em,
 determinação, 81
- Infecção (humana)
 por *Serratia marcescens*, 107
- Laboratórios de Saúde Pública, 1
- Leite (pasteurizado)
 qualidade de, na cidade de São Paulo,
 em relação à legislação brasileira, 19
- Leptospirose
 histopatologia, 75
 imuno-histoquímica, 75
 patogênese, 75
- Macarrão
 impurezas de origem biológica em, extração
 métodos, hidrólise ácida, hidrólise
 enzimática, 11
 impurezas de origem biológica em,
 identificação método microscópico, 11
- Medicamentos
 extrato hidroalcoólico de alho em,
 detecção, 5
 óleo essencial de alho em,
 detecção, 5
- Meningite bacteriana
 diagnóstico laboratorial, 61
- Óleo essencial de alho
 em medicamentos, identificação
 cromatografia em camada delgada, 5
- Óxido de etileno, resíduos
 em cânulas reesterilizadas, detecção, 27
 em seringas reesterilizadas, detecção, 27

Produtos farmacêuticos
veja em Medicamentos

Seringa (plástico)
esterilização com óxido de etileno, 27

Serratia marcescens
sorotipos, 107

SIDA
veja Síndrome de imunodeficiência
adquirida

Síndrome da imunodeficiência adquirida
anticorpos para *Toxoplasma gondii*,
prevalencia, 101

Tanino
da banana (*Musa sp.*)
em produtos de banana
industrializados, detecção
métodos microscópico, 35

Toxoplasmose
em pacientes com síndrome da
imunodeficiência adquirida (SIDA), 101

Trypanosoma
em hospedeiros não-humanos, diagnós-
tico técnicas parasitológicas, ava-
liação, 85

Vigilância epidemiológica, 1

Zinco, traços
em hortaliças, determinação, 81

SUBJECT INDEX

- Acquired immunodeficiency syndrome
antibodies to *Toxoplasma gondii*, prevalence, 101
- Aflatoxin
in peanut, determination
thin-layer chromatography, 41
in peanut products, determination
thin-layer chromatography, 41
- AIDS
see Acquired immunodeficiency syndrome
- Allium sativum*, 5
- Arsenic
in food additives, determination, 51
- Banana (*Musa* sp.)
tannin of, in banana manufactured products,
detection, 35
- Blood groups (ABO system)
correlation with giardiasis, 69
- Cadmium, traces
in vegetables, determination
flame atomic spectrophotometry, 81
- Cannula (plastic, rubber)
sterilization with ethylene oxide, 27
- Catgut
sterilization by gamma-ray
protein degradation, 57
sterilization, chemical, control, 57
- Epidemiology
surveillance, 1
- Ethylene oxide, residues
in reesterilized cannulae, detection, 27
in reesterilized syringes, detection, 27
- Food additives
arsenic in, determination,
methods, comparative study, 51
- Garlic (*Allium sativum*)
essential oil of, identification,
hidroalcoholic extract of, identification, 5
- Giardiasis
correlation with blood-groups
in São Caetano do Sul, São Paulo, Brazil,
69
- Infection (human)
due to *Serratia marcescens*, 107
- Intestinal diseases, parasitic
epidemiology
São Paulo, Brazil, 93
health planning, 93
- Lead, traces
in begetables, determination
flame atomic spectrophotometry, 81
- Leptospirosis
histopathology, 75
immunohistochemistry, 75
pathogenesis, 75
- Meningitis, bacterial
diagnosis, laboratory, 61
- Milk (pasteurized)
quality of, in São Paulo City, in relation to
Brazilian regulation, 19
- Oil
garlic essential oil
in pharmaceuticals, identification
thin-layer chromatography, 5
- Paste (macaroni)
animal filth in, extration
acid hidrolisis, pancreation diggestion
methods, 11
animal filth in, identification
microscopical method, 11
- Peanut
aflatoxin in, determination, 41
- Peanut products
aflatoxin in, determination, 41
- Pharmaceuticals
garlic essential oil in, detection, 5
garlic hidroalcoholic extract in, detection, 5
- Public Health Laboratories, 1
- Serratia marcescens*, serotypes, 107
- Sterilization
of cannulae (plastic, rubber)
with ethylene oxide, 27
of catgut
by gamma-ray, 57
of syringe (plastic)
with ethylene oxide, 27
- Syringe (plastic)
sterilization with ethylene oxide, 27
- Tannin
of banana (*Musa* sp.)
in banana manufactured products,
detect. microscopical method, 35
- Tea (medicinal plants)
species identification, 45
strange mineral material in, determination
acid-insoluble ashes method, 45
- Toxoplasmosis
in patients with acquired immunodeficiency
syndrome (AIDS), 101
- Trypanosoma*
in non-human hosts, diagnosis
parasitologic technics, avaiation, 85
- Vegetable
cadmium, lead, zinc in, determination, 81
- Zinc, traces
in vegetables, determination
flame atomic spectrophotometry, 81

