

RIAL -A

VOLUME 34

NÚMERO ÚNICO

1974

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSÉ PAULO GONZAGA DE LACERDA

LUÍS FLORENCIO DE SALLES GOMES

MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA

MÁRIO SCARPELLI

WALDOMIRO PREGNOLATTO

SECRETÁRIA-REDATORA

DÉBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

Endereço / *Address*

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

Publicação anual / *Annual publication*

Solicita-se permuta / *Exchange desired*

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. São Paulo, SP —
Brasil, 1941-

1941-1973, 1-33

1974, 34

○

Os artigos publicados na *REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ* são indexados por Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Excerpta Medica e Tropical Diseases Bulletin.

ERRATA

Na pág. do *CONTEÚDO/CONTENTS*

Artigo n.º 400, 6.ª linha

onde se lê

... Gil Vicente Alvares PESSÓA

leia-se

... Gil Vital Alvares PESSÓA

Artigo n.º 408, 5.ª linha

onde se lê

... of Neisserie meningitides: *detection through passive haemagglutination...*

leia-se

... of Neisseria meningitidis: *detection through passive haemagglutination...*

Na pág. 37, 2.ª col., parte c

onde se lê

100 X B

———— = nitrito, em nitrito de sódio por cento

P

leia-se

100 X B

———— = nitrato, em nitrato de sódio por cento

P

Na pág. 47, 2.ª col., 5.ª linha

onde se lê

contendo antibióticos...

leia-se

contendo o antibiótico...

Na pág. 51, na 13.ª linha do "SUMMARY"

onde se lê

... espiramycin...

leia-se

... spiramycin...

Na pág. 95, na 3.ª linha do título do resumo

onde se lê

... e doce do Braisl.

leia-se

... e doce do Brasil.

Na pág. 99, na tabela

onde se lê

Produtos do mar

leia-se

Produtos do mar e peixes de água doce

Na pág. 124, na 6.ª linha do "SUMMARY"

onde se lê

... was studies

leia-se

... was studied

Na pág. 131, 2.ª col., 4.ª linha

onde se lê

após 30 dias, 18% desses

leia-se

após 30 dias, os soros de 18% desses

Na pág. 133, na 5.ª e 6.ª linhas do "SUMMARY"

onde se lê

... Same techic...

leia-se

... Same technic...

onde se lê

... in patients wich...

leia-se

... in patients with...

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 34 (único), 1974

CONTEÚDO/CONTENTS

- 392 José Pedro de Carvalho Lima. Necrológio
José Pedro de Carvalho Lima. Necrology 1-7
- 393 Ação do corante laranja de acridina sobre os vírus herpético e vacínico em culturas celulares
Effect of the acridine orange dye on herpetic and vaccinic virus in cell cultures
Marta Irena MALACHOWSKA & Adela ROTH 9-17
- 394 Método para a identificação dos elementos histológicos e pesquisa de fungos em sucos e néctares de frutas
Method for microscopic identification of the histological components and search for fungi in fruit juices
Maria Virginia DECÂNIO 18-22
- 395 "Aspirina solúvel em lisina": estudo espectrofotométrico
"Spectrophotometric study on "Aspirin soluble in lysine"
Mário Franklin SCARPELLI & Maria Auxiliadora CHAVES 23-27
- 396 Determinação do sedimento, cascas e paus no café torrado e moído
Detection of sediment and peels in roasted ground coffee
Fernando Cerviño LOPEZ 29-34
- 397 Determinação espectrofotométrica de nitritos e nitratos em sais de cura
Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in curing brines
Walkyria H. LARA & Mickiko Y. TAKAHASHI 35-39

- 398 Determinação espectrofotométrica do sulfato de neomicina em medicamentos, diretamente e após separação por cromatografia em camada delgada.
Spectrophotometric determination of neomycin sulfate in pharmaceutical products by thin-layer chromatography
Waldomiro PREGNOLATTO & Myrna SABINO 41-46
- 399 Determinação espectrofotométrica de eritromicina em medicamentos
Spectrophotometric determination of erythromycin in pharmaceuticals
Waldomiro PREGNOLATTO & Neusa Santesso GARRIDO 47-51
- 400 Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no Município de São Paulo, Brasil
On the bacteriological study of Salmonella typhi strains isolated during an epidemic outbreak of typhoid fever in São Paulo, Brazil
Ernesto HOFER; Gil Vicente Álvares PESSÓA; José de Souza de MORAIS; Carmo Elias de Andrade MELLEES; Estevão José COLNAGO; Maria Diana LACERDA & Maria Ignez VILHENA 53-63
- 401 Características da buclizina e determinação por titulação espectrofotométrica em produtos farmacêuticos
On the characteristics of buclizine dihydrochloride and its detection through spectrophotometric titration
Waldomiro PREGNOLATTO & Narcildo Luiz PISSATTO 69-77
- 402 Método para identificação de sorbitol por cromatografia em camada delgada
Thin-layer chromatography method for identification of sorbitol
Walkyria H. Lara & Helena Y. YABIKU 79-81
- 403 Notas sobre alguns parasitas de ratos silvestres do Estado de São Paulo
Notes on some parasites found in wild rats from São Paulo, Brazil
Samuel B. PESSÓA 82-93
- 404 Pesquisa e determinação de mercúrio em peixes de água salgada e doce do Brasil
Research and detection of mercury residues in Brazilian salt and fresh water fishes
Waldomiro PREGNOLATTO; Neusa Santesso GARRIDO & Myriam de TOLEDO 95-100
- 405 Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano
Isolation of Listeria monocytogenes from cerebrospinal fluid
Chifumi TAKEUCHI; Gil Vital Álvares PESSÓA; Ernesto HOFER; Carmo Elias Andrade MELLEES & Mathilde RASKIN 101-107

406	Pneumonia por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> : apresentação de um caso clínico com a respectiva comprovação etiológica <i>Mycoplasma pneumoniae pneumonitis: a case report with etiological study</i> Sueko TAKIMOTO; Cláudio Sérgio PANNUTI; Guido Carlos LEVI; Vicente AMATO NETO; Heloisa Helena BARBOSA; Hatune TANAKA & Luís Florêncio SALLES-GOMES	109-117
407	Especificidade imunológica dos polissacarídeos extraídos de diferentes grupos de <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Immunological specificity of polysaccharides obtained from different groups of Neisseria meningitidis</i> Solange Barros CARBONARE; Augusta Kiyomi TAKEDA; Filomena B.M. JORDÃO & Augusto de E. TAUNAY	119-125
408	Anticorpos antipolissacarídeo C de <i>Neisseria meningitidis</i> : detecção através da hemaglutinação passiva em soros de pacientes e de vacinados <i>Antibodies against polysaccharide C of Neisserie maningitides: detection through passive haemagglutination in sera from patients and vaccinated normal persons</i> Augusta Kiyomi TAKEDA; Augusto de E. TAUNAY; Luiz G.P. SCALABRINI & Ivan de Oliveira CASTRO	127-133
INDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX		134
INDICE DE ASSUNTO		135-136
SUBJECT INDEX		137-138

A O S C O L A B O R A D O R E S

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 (evitando cortar as palavras no final da linha, mesmo que a margem fique irregular), com margens de 3 cm de cada um dos lados e numeradas com algarismos arábicos no ângulo superior direito. As ilustrações e respectivas legendas, e os rodapés serão apresentados à parte.

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. O título, traduzido para o inglês, deverá ser apresentado em folha à parte.

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, definidas em decretos (BRASIL. Sistema Nacional de Metrologia. *Decreto-lei n. 240 — de 28-2-1967, decreto n. 62.292 — de 22-2-1968* [e] *decreto n. 63.233 — de 12-9-1968*. [Rio de Janeiro, Gb., Impr. Nac., 1971] 48 p.).

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 de apresentação tabular" estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística (FUNDAÇÃO IBGE — *Normas de apresentação tabular*. Rio de Janeiro, Gb., Serv. Gráf. IBGE, 1972).

No corpo da tabela, nenhuma casa ficará vazia; segundo convenção internacional, a ausência de dados numéricos será representada por:

- | | |
|---------------------|--|
| — (traço) | quando o dado for nulo; |
| ... (três pontos) | quando não se dispuser do dado; |
| 0; 0,0; 0,00 (zero) | quando o valor numérico for menor do que a metade da unidade ou fração decimal adotada para a expressão do dado. |

ILUSTRAÇÕES (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.) — Serão designadas no texto como "figuras" (Fig.); 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, 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; assim, para um autor... TAUNAY³¹ verificou...; para dois autores... LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando...; para mais de dois autores... No trabalho de TSUNODA *et alii*¹²; 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), citando-se todos os autores do trabalho.

Para artigos

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*, 1900-1960. 4th ed. London, Butlerworths, 1963-5. 3 v.), número do volume, número do fascículo (se a numeração não for continuada), páginas inicial e final, ano de publicação.

Ex.

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

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra, edição (se não for a primeira), tradução (se for o caso), local de publicação, nome do editor, ano de publicação, número da(s) página(s) consultada(s). Se a obra for em mais de um volume, citar também o número do volume.

Ex.

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na Revista deverão ser encaminhados ao Setor de Publicações 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.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Na publicação do artigo, constará obrigatoriamente, em rodapé, a data de recebimento.
5. A primeira prova tipográfica será revisada pela secretária da Redação e conferida pelo autor, que a rubricará.
6. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
7. Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se previamente com a secretária da Revista.
8. *É proibida a reprodução no todo ou em parte de trabalhos publicados na Revista, sem prévia autorização do autor e do Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz. É permitida, entretanto, a reprodução de resumos, com a devida citação de fonte.*



JOSÉ PEDRO DE CARVALHO LIMA

† 26 - outubro - 1973

A 26 de outubro de 1940, ao proferir a oração com que inaugurava o recém-criado Instituto Adolfo Lutz, dizia o Professor José Pedro de Carvalho Lima que então estava realizando o maior sonho de sua vida.

Volvidos trinta e três anos, por amarga coincidência nessa mesma data, desaparecia aquele que foi incontestavelmente o idealizador dos Laboratórios de Saúde Pública no Brasil.

Para cumprir este grande ideal profissional, teve de trilhar longa e exaustiva caminhada em que as alegrias muitas vezes se seguiam a grandes decepções.

Principiando sua carreira em 1919 como assistente efetivo do Instituto Bacteriológico de São Paulo, já em 1923 era guindado à sua direção e designado logo a seguir para empreender uma longa viagem de estudos aos Estados Unidos da América do Norte e à Europa.

Ironicamente, por ocasião de seu regresso ao Brasil, quando — segundo suas palavras — já trazia em seu cérebro funcionando “um movimentado laboratório de Saúde Pública”, é obrigado a assistir impotente à extinção da instituição que dirigia e que precisamente deveria constituir o embasamento para a construção do seu ideal criativo.

Confessa ter sido esse dia o mais amargo de sua vida profissional, que suplanta com tenaz espírito de luta até 1931, data em que consegue reorganizar o Instituto Bacteriológico e iniciar a construção do laboratório de seus sonhos, para isso recolhendo pacientemente todo o aparelhamento que fora disperso e chegando até a vasculhar as velhas livrarias de São Paulo para reconstruir o acervo de uma biblioteca preciosa, iniciada nos fins do século.

Em 1937 novamente se encontra diante de um dilema: forçado pela lei das acumulações, deve optar entre a cátedra de Microbiologia na Universidade de São Paulo ou o cargo de Diretor do Instituto Bacteriológico que, graças ao seu esforço, voltava a produzir frutos. A opção foi a favor deste laboratório, declarando na ocasião que tinha um dever a cumprir e um programa a realizar, que o guiavam para o caminho mais espinhoso: o encargo de Diretor do Instituto Bacteriológico.

Certamente nessa ocasião já tinha consigo mestre Carvalho Lima o germe do futuro Laboratório de Saúde Pública do Estado de São Paulo, esquematizado nos seus menores detalhes.

Foi nessa ocasião que tivemos a satisfação de conhecê-lo, quando nos convidou para seu assistente na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e, logo a seguir, para assistente do Instituto Bacteriológico. Nas muitas vezes com que nos honrou em confiar os seus planos quando da criação do Laboratório de Saúde Pública de São Paulo — o Instituto Adolfo Lutz — proveniente da fusão do Instituto Bacteriológico e do Laboratório Bromatológico, sempre pudemos sentir o carinho com que esse laboratório vinha sendo meditado e estruturado por seu privilegiado criador.

Já no decreto de criação do Instituto Adolfo Lutz se prevê a necessidade de uma carreira para os seus técnicos de nível superior, tendo Carvalho Lima proposto a carreira de Biologista e de Químico para os portadores de títulos universitários, e a exigência do curso secundário, para os técnicos de nível médio.

Por sua inspiração, partindo do Laboratório Central da Capital, a célula-mater começa a expandir-se pelo Interior do Estado com a instalação dos Laboratórios Regionais, sendo logo postos a funcionar os de Campinas, Ribeirão Preto e Santos, este em prédio adrede construído.

Instalados e aparelhados os novos laboratórios, não se descuidou Carvalho Lima de criar para os novos colaboradores que arregimentou um ambiente de trabalho agradável, onde se sentia sempre presente a sua influência benéfica. Entrevistava pessoalmente todos os novos auxiliares, determinava com exatidão o que de cada um se esperava e incentivava a todos no campo do trabalho que vinham realizando.

Seu interesse pertinaz nem sempre era bem compreendido e, à primeira vista, Carvalho Lima granjeava a fama de homem distante e de difícil comunicação. No entanto, não demorava muito para que todos se dessem conta de que a sua aparente aspereza escondia uma criatura dotada dos mais nobres sentimentos, amigo de seus amigos, dos seus auxiliares, e cuja grande meta era defender o seu Instituto e fazê-lo progredir, o que conseguiu plenamente quando se considera o renome que logo conquistou para a nova instituição e o sem número de trabalhos científicos que foram publicados quando era o redator responsável pela "Revista do Instituto Adolfo Lutz", esta também criada por sua inspiração.

Estimulando seus colaboradores a se dedicarem à pesquisa nos mais variados campos da Saúde Pública, dava ele próprio o exemplo pois, apesar dos seus inúmeros encargos, não se descuidava de também pesquisar, como bem o demonstra a respeitável bagagem científica que legou e seu importante livro de texto, o "Tratado de Bacteriologia".

Esse estafante trabalho não demorou a produzir frutos: em curto período, foram aperfeiçoados as técnicas e os métodos de exame para diagnóstico das moléstias transmissíveis, enquanto no campo da Bromatologia principiou-se a padronizar as técnicas de exame e a promover uma campanha educativa com a finalidade de facilitar aos produtores de alimentos e medicamentos o controle de sua produção com evidentes benefícios para a saúde pública.

Por decreto de 27 de abril de 1948, ainda na plenitude de sua capacidade física, aposentou-se, a pedido, do alto cargo de Diretor do Instituto Adolfo Lutz aquele que pela força de sua fé e abnegação à causa pública criou no Brasil um órgão inédito para nós — o Laboratório de Saúde Pública.

Ao se aposentar pôde o mestre cumprir ainda um segundo ideal, o de retornar à sua cátedra na Universidade de São Paulo, onde professou ainda por vários anos e teve a ventura a poucos concedida de ver sua obra ali continuada por seu filho Lúcio Penna de Carvalho Lima.

Sejam estas palavras nossa homenagem póstuma ao criador do Instituto Adolfo Luiz e esperemos que o seu exemplo sempre vivo nesta Casa mostre a todos o que pode realizar a fé e a tenacidade de um homem de caráter que luta por uma idéia generosa.

Porventura melhor que nós, os pósteros reconhecerão quanto todos devemos a esse homem raro que, ao realizar o seu ideal criativo, contribuiu enormemente para a saúde e a educação dos brasileiros.

Augusto de Escragnolle Taunay

CURRICULUM VITAE

Nasceu José Pedro de Carvalho Lima em Mococa, São Paulo, a 14 de fevereiro de 1894. Era filho de Firmino de Oliveira Lima e de Laudelina de Carvalho Lima e foi casado com D. Hilda Penna de Carvalho Lima.

Fez os cursos primário e secundário no Colégio Arquidiocesano de São Paulo, de 1905 a 1911, quando recebeu o diploma de Bacharel em Ciências e Letras.

Ingressou na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro em 1912, doutorando-se em Medicina a 29 de dezembro de 1917, após ser aprovado com distinção em defesa da tese: Contribuição ao estudo da Vacinoterapia da Coqueluche.

Durante o curso médico ocupou os seguintes cargos: monitor (auxiliar acadêmico) da cadeira de Microbiologia, sendo catedrático o Professor Bruno Lobo;

interno da Maternidade do Rio de Janeiro (Laranjeiras), da qual era diretor o Professor Fernando de Magalhães, e interno da cadeira de Pediatria, da qual era catedrático o Professor Simões Correia.

Fez vários estágios e cursos de especialização:

Em 1918, estágios de especialização em Bacteriologia nos Institutos: Manginhos, no serviço do Professor Henrique Aragão; Butantan, serviço a cargo do Dr. João Florêncio Gomes, e Bacteriológico, sob a direção de Theodoro Bayma, com quem iniciou os primeiros trabalhos, em 1917, para a tese de doutoramento;

De maio a setembro de 1923 (Bolsa de Estudos da Rockefeller Foundation) fez, em Albany, na "Division of Laboratories and Research" do Departamento de Saúde do Estado de New York, um curso de especialização em laboratórios de Saúde Pública;

De setembro de 1923 a janeiro de 1924 (Bolsa Rockefeller) fez, na Harvard University, em Boston, cursos regulares de Bacteriologia e Anatomia Patológica. Durante esse período, realizou trabalhos especiais de Bacteriologia com o Professor Hanz Zinsser e de Anatomia Patológica com o Professor Burt Wolbach;

Em 1924, fez estágios em várias instituições: Laboratório Higiênico de Washington, onde estudou o assunto dos Pneumococos e das Brucelas com Alice Evans; Universidade de Pensilvânia, onde estudou com o Professor Kolmer a sua técnica da reação de Wassermann; Instituto Pasteur de Paris, estudo, com o Professor Besredka, das questões da imunidade local e da vacinação com antivírus, e também da fixação do complemento na tuberculose; no Hôpital Saint-Louis, de Paris, acompanhou o serviço do Professor Sabouraud, sobre os cogumelos da tinas.

Ainda, em junho de 1924, visitou em Hamburgo o Hospital de Moléstias Tropicais, onde trabalhava o cientista português Professor Rocha Lima; foi a Berlim, tendo visitado o Professor Wassermann no Instituto que tem o seu nome, e o Professor Neufeld, no Instituto Roberto Koch, de quem obteve preciosos ensinamentos.

Fez parte de várias Comissões Examinadoras de Concurso da Universidade de São Paulo, da Bahia, do Paraná.

Participou de numerosas Comissões, desempenhando funções de destaque:

Presidente da Comissão do Departamento de Saúde, encarregada do estudo da Febre Ondulante;

Representante do Departamento de Saúde na "Comissão de Investigações da Poluição das Águas de São Paulo";

Representante da Faculdade de Farmácia e Odontologia no Congresso Internacional de Microbiologia, realizado no Rio de Janeiro, de 17 a 24 de agosto de 1950 e do qual foi vice-Presidente da 2.^a sub-seção, Bacteriologia;

Membro da "Comissão encarregada de proceder à revisão do Regulamento do Policiamento Sanitário da Alimentação Pública";

Presidente da Comissão encarregada de coordenar os serviços contra eventual surto epidêmico de gripe no Estado, em 1944;

Representante do Departamento de Saúde na I Semana de Previdência e Assistência Social, realizada em São Paulo a 5-11-1944, sob os auspícios do Instituto de Direito Social;

Chefe da Comissão que representou o Departamento de Saúde no Congresso Brasileiro dos Problemas Médico-Sociais de Após Guerra, realizado na Cidade de Salvador, Bahia, em 1945;

Representante do Diretor Geral do Departamento de Saúde, junto à Primeira Jornada Brasileira de Bromatologia, realizado de 3 a 13 de abril de 1946, em São Paulo;

Presidente da Comissão do Ministério do Exterior para a fiscalização de entorpecentes no Estado, em 1944 e 1945;

Secretário da Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo (Presidência de Adolfo Lindemberg e de Pinheiro Cintra);

Membro de honra das Jornadas comemorativas do Cinquentenário da Fundação da "Liga Paulista contra a tuberculose", realizada de 17 a 24 de julho de 1949;

Membro do Segundo Congresso Médico Paulista, comemorativo do cinquentenário da Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo;

Presidente da Comissão dos Arquivos de Higiene e Saúde Pública, publicação do Departamento de Saúde, em 1944 e 1945;

Primeiro Representante da Faculdade de Farmácia e Odontologia, no Conselho Universitário, de 1934 a 1938 (Diretorias Benedito Montenegro, Raul Vargas Cavaliheiro e Linneu Prestes);

Presidente da Comissão encarregada de dar parecer sobre os serviços do Instituto Pasteur de São Paulo, em São Paulo, em 1954;

Fundador da Revista do Instituto Adolfo Lutz.

Os principais cargos exercidos, ao longo de sua carreira, foram: monitor (auxiliar acadêmico) da cadeira de Microbiologia da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro; médico sanitarista (por concurso) do Departamento de Saúde de São Paulo; médico (por concurso) da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo; assistente do Instituto Bacteriológico do Departamento de Saúde de São Paulo; diretor do Instituto Bacteriológico do Departamento de Saúde de São Paulo; "Research fellow", em Bacteriologia, da Harvard University, Boston, E. U. A.; diretor do Serviço de Laboratórios de Saúde Pública, do Departamento de Saúde de São Paulo; diretor superintendente do Instituto Butantan, São Paulo; diretor do Instituto Pasteur de São Paulo; diretor do Instituto Adolfo Lutz, do Departamento de Saúde de São Paulo e professor catedrático de Microbiologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo.

Em março de 1968, a Congregação da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, considerando os serviços relevantes prestados ao ensino universitário, concedeu-lhe o título de "Professor Emérito".

Grande parte de sua atividade profissional se desenvolveu dentro dos laboratórios de Saúde Pública do Departamento de Saúde de São Paulo — Instituto Bacteriológico, Pasteur, Butantan e Adolfo Lutz.

Fruto de sua experiência, publicou, de 1917 a 1956, os seguintes trabalhos:

Trabalhos publicados

- 1917
LIMA, J.P.C. — *Contribuição ao estudo da vacinoterapia da coqueluche*. Rio de Janeiro, 1917. [Tese — Fac. Med. Rio de Janeiro] 1
- 1918
LIMA, J.P.C. et al. — *Campanha contra a ancilostomose*. São Paulo, Serviço Sanitário, 1918. 2
- 1920
LIMA, J.P.C. — *Notas sobre a infestação humana pelos "Hymenolepis" e sua prophylaxia*. *Bolm. Soc. Med. Cirurg.* (São Paulo), 3: 256-60, 1920. 3
- 1921
LIMA, J.P.C. — *A reação do ouro colloidal*. *Bolm. Soc. Med. Cirurg.* (São Paulo), 4 (9): 236-40, 1921. 4
LIMA, J.P.C. — *Tratamento da syphilis pelo bismuto*. *Bolm. Soc. Med. Cirurg.* (São Paulo), 4 (9): 240-1, 1921. 5
- 1924
LIMA, J.P.C. — *Dosagem de antitoxina "in vitro"*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 12: 25-30, 1924. 6
- 1925
LIMA, J.P.C. — *A vaccina antityphica*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 13: 25-30, 1925. 7
- 1926
LIMA, J.P.C. — *Hemocultura nas endocardites*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 14: 41-5, 1926. 8
- 1929
LIMA, J.P.C. — *Bacteriologia das endocardites*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 20: 217-222, 1929. 9
- 1930
LIMA, J.P.C. — *Bacillos dysentericos Shiga e Schmitz. Diferenciação pela rhamnose*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 21: 133-5, 1930. 10
- 1932
LIMA, J.P.C. — *Bacteriologia*. *Bras. Méd.*, 46: 643-5, 1932. [Aula inaugural na Escola de Pharmacia e Odontologia de São Paulo] 11
- LIMA, J.P.C. — *Diagnóstico e vaccinoterapia da coqueluche*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 24: 195-8, 1932. 12
- LIMA, J.P.C. — *Endocardite rheumatica e Streptococcus cardio-arthritis*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 24: 15-7, 1932. 13
- LIMA, J.P.C. — *Espermocultura*. *Bras. Méd.*, 46: 500-1, 1932. 14
- LIMA, J.P.C. — *Meningites bacterianas em São Paulo*. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 24: 145-9, 1932. 15
- 1933
LIMA, J.P.C. — *Bacillo Proteus XI e typho exanthematico de São Paulo*. *Bras. Méd.*, 47: 64-6, 1933. 16
LIMA, J.P.C. — *Bacteriologia*. São Paulo, Impressora paulista, 1933. [2.^a ed., 1934; 3.^a ed., 1939; 4.^a ed., 1945] 17
- 1934
LIMA, J.P.C. — *Laboratório Clínico e Odontologia*. *Rev. Farm. Odont.* (Rio de Janeiro), 1 (1): 35, 1934. 18
LIMA, J.P.C. — *Vacinas contra a coqueluche*. *Hipocratea*, 1 (1): 99, 1934. 19
- 1936
LIMA, J.P.C. — *Séro-diagnostico da febre typhoid*. *Publicões méd.*, 8 (5): 6-10, 1936. 20
- 1938
LIMA, J.P.C. — *Hemocultura em "liquoid"*. *Bras. méd.*, 52: 1184-6, 1938. 21
- GOMES, L.S.; BARRETTO NETTO, L.P. & LIMA, J.P.C. — *Sobre dois casos de empyema de origem eberthiana observados em São Paulo*. *Bras. méd.*, 52: 203-5, 1938. 22
- 1939
LIMA, J.P.C. & ARANTES, M. — *Cultura do bacilo da Lepra*. *Rev. bras. Leprol.* (São Paulo), 7: 391-403, 1939. 23

1940

LIMA, J.P.C. — Adolfo Lutz. *Rev. Soc. Med. Cirurg.*, 1940, [Necrológio] 24

LIMA, J.P.C. — Virus da paralisia infantil. *Pediatr. prat.*, 11: 317-28, 1940. [Palestra] 25

LIMA, J.P.C. & ARANTES, M. — Hemocultura em líquido, II. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 39: 87-92, 1940. 26

LIMA, J.P.C. & TELES, L.Q. — Bacilos disentericos intermediários. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 40: 179-90, 1940. 27

LIMA, J.P.C. & TELES, L.Q. — Produção de hidrogênio sulfurado pela *Shigella ambigua* (Andrewes) Weldin. *Anais paul. Med. Cirurg.*, 39: 9-17, 1940. 28

1941

LIMA, J.P.C. — Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1 (1): 5-20, 1941. 29

1942

LIMA, J.P.C. & TELES, L.Q. — Demonstração de cápsulas bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2: 191-211, 1942. 30

1943

LIMA, J.P.C. — Artur Neiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3: 225-31, 1943. [Necrológio] 31

LIMA, J.P.C. & ARANTES, M. — Vacinação contra a coqueluche. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3: 9-19, 1943. 32

1945

LIMA, J.P.C. — Os Laboratórios de Saúde Pública nas organizações sanitárias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5: 267-78, 1945. 33

1956

LIMA, J.P.C. — Presença de Adolfo Lutz na Faculdade de Farmácia e Odontologia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 16: 5-13, 1956. 34

AÇÃO DO CORANTE LARANJA DE ACRIDINA SOBRE OS VÍRUS HERPÉTICO E VACÍNICO EM CULTURAS CELULARES *

Marta Irena MALACHOWSKA **
Adela ROTH **

RIAL-A/393

MALACHOWSKA, M.I. & ROTH, A. — Ação do corante laranja de acridina sobre os vírus herpético e vacínico em culturas celulares. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 9-17, 1974.

RESUMO: Estudou-se a ação inibidora do corante foto-sensibilizante laranja de acridina (LA) sobre os vírus herpético e vacínico. A ação conjunta do corante e luz resultou em 100% de inibição do crescimento dos vírus, quando o LA esteve em contacto durante 1 hora com os vírus. Não se observou qualquer partícula viral nas micrografias eletrônicas, enquanto que nas células inoculadas com vírus expostos à luz, mas sem LA, observaram-se numerosas partículas de vírus. A microscopia fluorescente demonstrou diminuição de ADN em células inoculadas com mistura de LA e vírus (VLA) em comparação com os controles de células normais.

DESCRITORES: laranja de acridina, ação sobre o vírus; vírus, herpético e vacínico.

I N T R O D U Ç Ã O

Numerosos investigadores descreveram a ação inibidora dos metais pesados¹⁰ e dos corantes foto-sensibilizantes sobre o crescimento de alguns vírus, destacando que a exposição à luz é relevante nestas inibições. O mecanismo intrínseco da inibição dos vírus não está bem esclarecido. Uma das teorias sugere que os corantes fotodinâmicos inibem a síntese das proteínas citoplasmáticas⁵; outra teoria, mais frequentemente citada, admite que estes coran-

tes ligam-se aos ácidos nucléicos virais, transferindo a eles a energia da luz *** causando, desta maneira, o rompimento da sua estrutura 7, 8, 9, 13, 16, 21. Diversos trabalhos usando métodos bioquímicos sugerem a degradação ou destruição da guanina do ADN para explicarem este mecanismo^{3,6,12,14}. Há aproximadamente 40 anos vêm se realizando estudos da ação fotodinâmica dos corantes procurando, como resultado prático, a inibição de crescimento dos agentes infecciosos que poderia ser utilizada em terapêutica. Recentemente, apareceram trabalhos onde

* Realizado na Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** ROTH, A. & MALACHOWSKA, M.I. — Ação dos corantes foto-sensíveis sobre *Herpesvirus hominis*. São Paulo, 1973. [Trabalho não publicado]

se relatam êxitos clínicos, utilizando o fotodinamismo do vermelho neutro e da proflavina em lesões herpéticas de pele⁴ e de queratite herpética¹².

Em vista destes resultados, resolveu-se estudar a ação fotodinâmica do corante laranja de acridina, *in vitro*, o qual tem sido utilizado por numerosos autores para o estudo da inibição do crescimento de agentes, como poliovírus^{11, 17}, vírus de mosaico das plantas, herpesvírus e colífago⁷. Na literatura, não foi encontrada qualquer referência ao efeito da laranja de acridina* sobre os vírus herpético e vacínico nos sistemas celulares usados neste trabalho.

Ainda, foi escolhido este corante pela sua notável propriedade de corar diferencialmente o ADN do ARN e de poder corar células vivas. Pelo fato de não encontramos qualquer citação na literatura referente às alterações morfológicas dos vírus após o tratamento com corante e luz, neste trabalho procurou-se investigar este assunto através da microscopia eletrônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus

Foram utilizados:

a) *Herpesvírus hominis* (HVH) tipo I, cepa McIntire, com passagens em culturas celulares SIRC e titulado nas mesmas células. Título do vírus 10⁶ por 0,1 ml.

b) *Poxvírus officinale*, cepa denominada Bt pela Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P. (vírus contido na vacina anti-variólica produzida pelo Instituto Butantan, São Paulo, S. P.), cultivado e titulado em células Vero-Maru; título do vírus 10⁵ por 0,1ml.

Culturas celulares

Foram utilizadas:

a) Células SIRC** — linhagem contínua de córnea de coelho, com 53 passagens neste laboratório.

b) Células Vero-Maru*** — linhagem contínua de rim de macaco, com 50 passagens neste laboratório.

Meios de cultura

Como meios de manutenção foram usados: o meio 199 com 1% de soro de vitelo para células SIRC, e meio de Eagle com 2% de soro de vitelo para as células Vero-Maru.

Corante fotodinâmico

O corante laranja de acridina (LA) foi dissolvido a 1% em salina tamponada com pH ajustado a 7,2 e mantido em geladeira a 4°C em frasco escuro.

Exposição à luz

Os sistemas celulares foram expostos durante 1 hora à luz da lâmpada de 60 W, de vidro transparente, a 60 cm de distância das células. A temperatura externa dos tubos durante a exposição não excedeu a 22°C.

Inoculações

Inicialmente várias quantidades de LA com TCD 50% de vírus foram experimentadas. Foi escolhida a dose de 4 microgramas que não alterou as células, mas inibiu a ação do vírus.

As inoculações foram feitas de três modos:

a) mistura de 0,1 ml de vírus (contendo 100 TCD 50%) com 4 microgramas de LA (VLA) no volume de 0,1 ml. Destas misturas foram inoculados 0,2 ml por tubo;

b) inoculações de 4 microgramas de LA e em seguida o vírus na mesma quantidade e volume como no item a;

c) inoculações de LA e, 24 horas depois, o vírus nas mesmas quantidades e volumes citados.

* Merck.

** Recebidas do Dr. Yorgen Leerhoy de Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca.

*** Recebidas da American Type Culture Collection.

As inoculações foram executadas em duas séries: a 1.^a exposta uma hora à luz e a 2.^a feita em câmara escura com lâmpada vermelha de tipo usado em fotografia. Nesta série, os tubos foram protegidos com papel de alumínio. Para cada alternativa, usaram-se 4-6 tubos de células. Os sistemas foram observados ao microscópio diariamente e a leitura final foi feita no 7.^o dia após a inoculação.

Teste de vírus com LA

Células inoculadas com VLA e que não mostraram efeito citopático eram congeladas e descongeladas três vezes, centrifugadas, e o sobrenadante era inoculado em novas células.

Microscopia fluorescente

Para observação direta em microscopia fluorescente, foram preparadas lâminas com células normais, células inoculadas apenas com vírus e células inoculadas com VLA. Todas as amostras desta experiência foram expostas à ação da luz. Foram experimentadas três variações de preparações destas lâminas:

1. Fixação com acetona, tratamento com tampão fosfato pH 6,4, coloração com LA a 0,01% e montagem em tampão fosfato pH 6,4.

2. Fixação com acetona, tratamento com tampão Mc Ilvain pH 4,0; coloração com LA a 0,01% e montagem em tampão Mc Ilvain pH 4,0.

3. Fixação com acetona, tratamento com tampão fosfato pH 8,0; coloração com LA a 0,01% e montagem em glicerina¹, pH 9,0.

Microscopia eletrônica

As células inoculadas com vírus e as inoculadas com VLA foram observadas ao microscópio eletrônico. Estas amostras foram coradas pelo acetato de uranila a 2%, embebidas em resina PolyLite T-208 e cortadas no ultramicrotomo Porter-Blum. As seções coradas pelo método de Reynolds foram examinadas ao microscópio eletrônico Philips EM-200 operando a 60 KV.

R E S U L T A D O S

Nas experiências constantes da figura 1, verificou-se que, quando os vírus foram inoculados isoladamente (controle dos vírus), na presença ou na ausência de luz, houve crescimento representado por 100% de efeito citopático (letra A da figura 1).

Quando a mistura vírus e corante (VLA) foi exposta à luz por 1 hora e inoculada no sistema celular, verificou-se após 7 dias de observação, que houve inibição do crescimento do vírus, fato demonstrado por passagens posteriores. Por outro lado, houve crescimento do vírus representado por 100% de efeito citopático quando as inoculações foram feitas na ausência da luz (letra B da figura 1).

Quando o corante LA foi adicionado 24 horas antes do vírus, verificou-se que nos tubos expostos à ação da luz houve discreto crescimento do vírus representado por aproximadamente 20-30% de efeito citopático. Nos tubos não expostos à ação da luz houve crescimento do vírus igual aos dos controles, isto é, 100% de efeito citopático (letra C da figura 1).

Quando a adição do corante LA foi feita imediatamente após a inoculação do vírus, verificou-se que, nos tubos expostos ou não à ação da luz, houve crescimento igual aos dos controles dos vírus (letra D da figura 1).

Dois experimentos visaram verificar, nas culturas celulares inoculadas com VLA e nas quais não houve efeito citopático, se os vírus ainda estavam presentes, mas inativados, ou se estavam presentes em forma incompleta. Destes experimentos resultou o seguinte:

- a) células inoculadas com o resultante da inoculação anterior de VLA expostas à luz foram observadas durante 7 dias, sem apresentarem indício de efeito citopático, permanecendo com a morfologia usual.

- b) micrografias eletrônicas demonstraram numerosas partículas virais nas amostras inoculadas somente com vírus, enquanto que em vários cortes de células inoculadas com VLA não se observou nenhuma partícula viral (fig. 2 a e b).

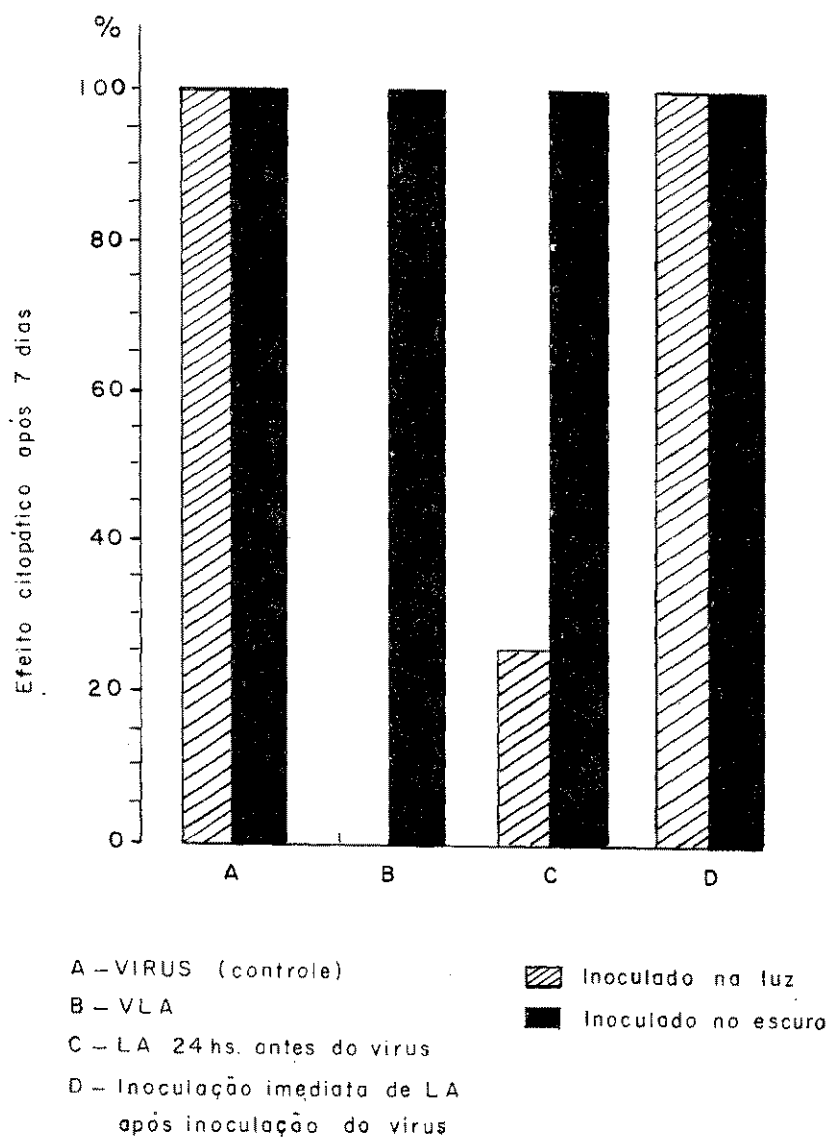


Fig. 1 — Resultados das inoculações com os vírus e corante em culturas de tecidos.

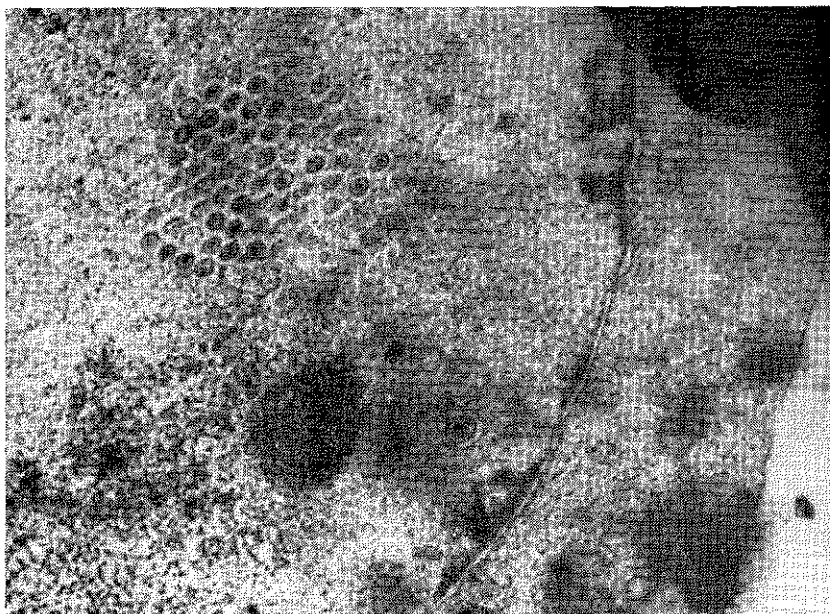


Fig. 2 a) Micrografia eletrônica da célula inoculada somente com vírus, onde se observam várias partículas virais.

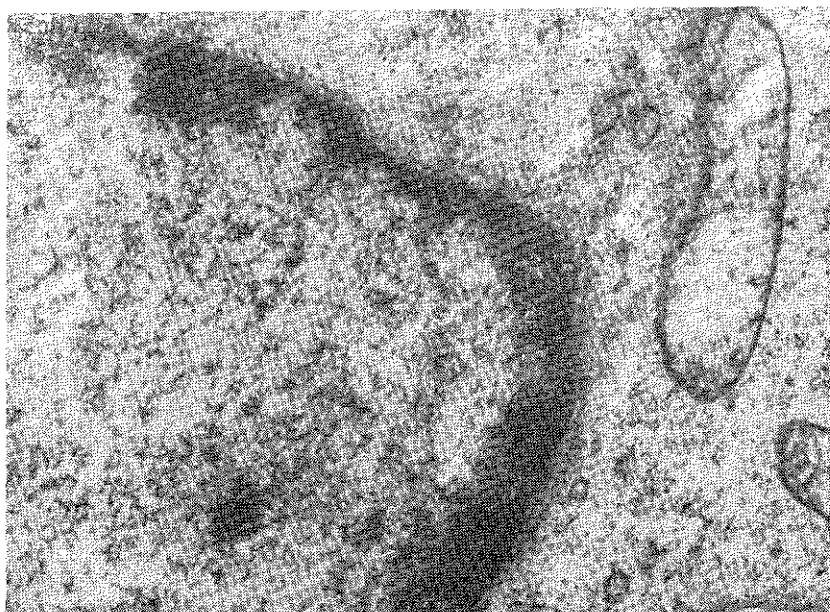


Fig. 2 b) Micrografia eletrônica da célula inoculada com vírus e corante, onde não se observa nenhuma partícula viral.

Para o exame pela microscopia fluorescente, foram preparadas lâminas das células normais e das células submetidas ao tratamento com vírus e corante LA.

Ao exame, as células normais não apresentavam alterações visíveis e os núcleos demonstravam cor amarelo-esverdeada com pontos avermelhados correspondendo aos nucléolos, e o citoplasma detinha cor vermelha intensa (fig. 3a).

Nas lâminas com células inoculadas somente com vírus observaram-se alterações morfológicas das células caracterizadas por aumento e granulação do núcleo que se corava de amarelo-esverdeado intenso correspondendo ao ADN, e pouco restava do citoplasma corado em vermelho, correspondendo ao ARN (fig. 3b).

As lâminas com as células inoculadas com VLA expostas à luz mostraram, na sua grande maioria, células coradas em seu citoplasma de cor vermelha intensa (ARN) e discreta diminuição de cor amarela correspondente ao ADN no núcleo. Em geral estas células são comparáveis às células-controle normais (fig. 3c).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Constatou-se que a ação conjunta de laranja de acridina e da luz inibe o crescimento dos vírus herpético e vacínico nas culturas celulares usadas. Estes vírus, isoladamente, expostos à luz sem a presença do corante, não demonstraram qualquer sensibilidade à luz. A ação do corante LA sobre os vírus não foi instantânea. Com efeito, quando o LA foi adicionado às células simultaneamente com os vírus não houve inibição do crescimento dos vírus, isto é, houve crescimento evidenciado por efeito citopático em todas as células. A inibição do crescimento dos vírus foi obtida quando o sistema VLA foi exposto por 1 hora à luz. O mesmo fenômeno foi observado por

BOOTH ², com o vírus da rubéola tratado com proflavina, e por WALLIS ¹⁹, que tratou o poliovírus com vários corantes como o vermelho neutro, azul de toluidina ou proflavina.

Como o vírus inoculado após 24 horas da adição do corante foi parcialmente inibido, supõe-se que restos do corante foram suficientes, quando expostos à luz, para inibir, em parte, o crescimento do vírus.

Nas experiências com culturas celulares cultivadas conjuntamente com o corante e posteriormente inoculadas com vírus herpético ou vacínico na ausência e presença da luz não se obteve inibição do vírus. Entretanto, WILSON ²², constatou inibição do poliovírus, realizando este tipo de experimentos com o corante vermelho neutro. No presente estudo, jamais se observou qualquer inibição do crescimento dos vírus na ausência de luz. A única menção de inibição de crescimento na ausência de luz encontrada na literatura foi no trabalho de WALLIS ²⁰, que inativou adenovírus com azul de toluidina.

A teoria sobre as alterações causadas no DNA viral pela transferência da energia da luz pelos corantes foto-sensibilizantes parece concordar com os achados na microscopia eletrônica que revelaram nas células com VLA ausência completa dos vírus. Isto sugere que a luz e o corante destroem não somente os ácidos nucléicos, mas também, as proteínas citoplasmáticas, em outras palavras, o vírus completo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes e ao D. Juan J. Angulo pelas sugestões na redação do trabalho. Ao Dr. Dalton R. Weigl, pelas micrografias eletrônicas e ao Sr. Justino da Silva, pelas fotografias da microscopia fluorescente.

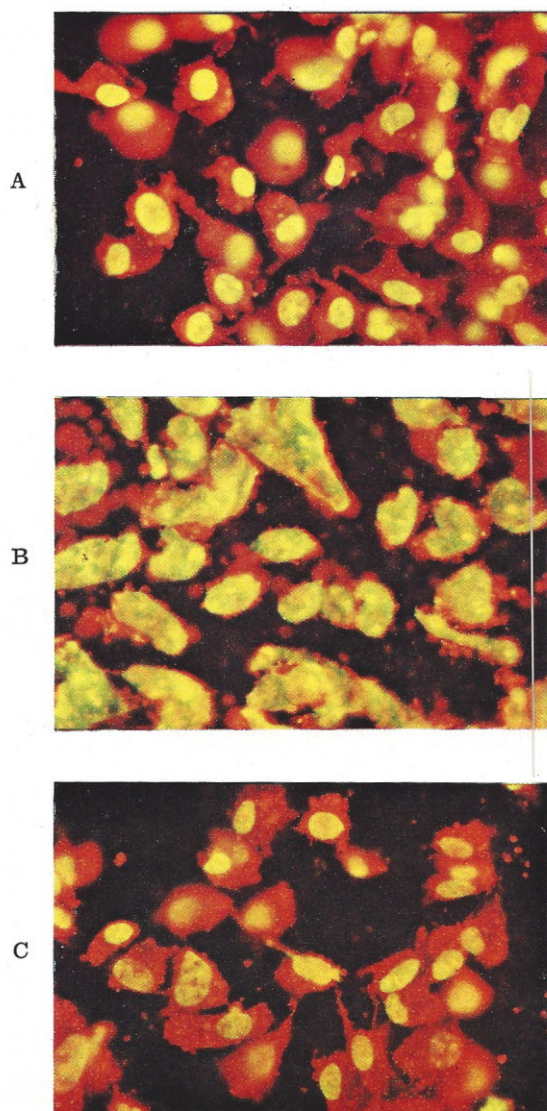


Fig. 3 a) Células SIRC normais.
b) Células SIRC inoculadas com vírus
c) Células SIRC inoculadas com vírus e com corante.

RIAL-A/393

MALACHOWSKA, M.I. & ROTH, A. — Effect of the acridine orange dye on herpetic and vaccinic virus in cell cultures. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 9-17, 1974.

SUMMARY: The inhibiting action of the photosensitizing acridine orange dye (AO) on herpetic and vaccinic viruses was studied.

The combined effect of both the dye and the light on these viruses caused a 100% inhibition of growth after an one hour period of contact with the dye; no virus particle could be observed on the electron micrographs of these cells. In those cells which were inoculated with the virus under light but without having been put in contact with AO, several virus particles were observed. Fluorescent microscopy evidenced a decrease of DNA in those cells inoculated with AO and virus, as compared with the amount of DNA in normal cells.

DESCRIPTORS: acridine orange, effect on the virus; virus, herpetic and vaccinic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERTALANFFY, L. von & BICKIS, I. — Identification of cytoplasmic basophilia (Ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 4: 481-93, 1956.
2. BOOTH, J.C. & STERN, H. — Photodynamic inactivation of rubella virus. *J. med. Microbiol.*, 5: 515-28, 1972.
3. DRAKE, J.W. & McGUIRE, J. — Properties of *r* mutants of bacteriophage T4 photodynamically induced in the presence of thiopyronin and psoralen. *J. Virol.*, 1: 260-7, 1967.
4. FELBER, T.D.; SMITH, E.B.; KNOX, J. M.; WALLIS, C. & MELNICK, J.L. — Photodynamic inactivation of herpes simplex. *J. am. med. Ass.*, 223: 289-92, 1973.
5. FRANKLIN, R.M. — The synthesis of fowl plague virus products in a proflavine-inhibited tissue culture system. *Virology*, 6: 525-39, 1958.
6. FREIFELDER, D. & URETZ, R.B. — Mechanism of photoinactivation of coliphage T7 sensitized by acridine orange. *Virology*, 30: 97-103, 1966.
7. HIATT, C.W.; KAUFMAN, E.; HELPRIN, J.J. & BARON, S. — Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. *J. Immun.* 84s 480-4, 1960.
8. HILL JR., R.B.; BENSCH, K.G. & KING, D.W. — Photosensitization of nucleic acids and proteins. The photodynamic action of acridine orange on living cells in culture. *Expl Cell Res.*, 21: 106-17, 1960.
9. LEI, J.C. — Der intravirale charakter der proflavinsensibilisierten Photoinaktivierung des Maul-und-Klauenseuche-Virus. *Arch.exp. VetMed.*, 24: 125-39, 1970.
10. MALACHOWSKA, M.I. & ROTH, A. — Ação do ferro sobre o grupo dos poxvirus in vitro. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 57-61, 1971.
11. MAYOR, H.D. — Cytochemical and fluorescent antibody studies on the growth of poliovirus in tissue culture. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 19: 106-22, 1961.
12. MOORE, C.; WALLIS, C.; MELNICK, J. L. & KUNS, M.D. — Photodynamic treatment of herpes keratitis. *Infection & Immunity*, 5: 169-71, 1972.
13. ORLOB, G.B. — Some effects of photosensitizing dyes on three plant viruses. *Virology*, 21: 291-9, 1963.

14. ROMANOWSKAJA, L.N. *et alii* — K Woprosu o mehanizmie zwiazywania akridinowych Krasitielej z nukleinowymi kisletemi. *Biofizika*, **17**: 313-36, 1972.
15. ROSS, R.W. & ORLANS, E. — The redistribution of nucleic acid and the appearance of specific antigen in HeLa cells infected with herpes virus. *J. Path. Bact.*, **76**: 393-402, 1958.
16. SASTRY, K.S. & GORDON, M.P. — The photodynamic inactivation of tobacco mosaic virus and its ribonucleic acid by acridine orange. *Biochim. biophys. Acta*, **129**: 32-41, 1966.
17. SCHAFFER, F.L. & HACKETT, A.J. — Early events in poliovirus-HeLa cell interaction: acridine orange photosensitization and detergent extraction. *Virology*, **21**: 124-6, 1963.
18. SHORTT, H.E. & BROOKS, A.G. — Photodynamic action of methylene blue on fixed rabies virus. *Indian J. med. Res.*, **21**: 581-5, 1934.
19. WALLIS, C. & MELNICK, J.L. — Photodynamic inactivation of poliovirus. *Virology*, **21**: 332-41, 1963.
20. WALLIS, C. & MELNICK, J.L. — Irreversible photosensitization of viruses. *Virology*, **23**: 520-7, 1964.
21. WALLIS, C.; SCHEIRIS, C. & MELNICK, J.L. — Photodynamically inactivated vaccines prepared by growing viruses in cells containing neutral red. *J. Immun.*, **99**: 1134-9, 1967.
22. WILSON, J.N. & COOPER, P.D. — Aspects of the growth of poliovirus as revealed by the photodynamic effects of neutral red and acridine orange. *Virology*, **21**: 135-45, 1963.

Recebido para publicação em 6 de novembro de 1973.

MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS HISTOLÓGICOS E PESQUISA DE FUNGOS EM SUCOS E NÉCTARES DE FRUTAS *

Maria Virginia DECANIO **

RIAL-A/394

DECANIO, M.V. — Método para a identificação dos elementos histológicos e pesquisa de fungos em sucos e néctares de frutas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 18-22, 1974.

RESUMO: O método foi introduzido visando a retenção total e identificação dos elementos histológicos constituintes dos sucos e néctares de frutas, pois muitos destes elementos se perdem durante a operação de decantação do líquido sobrenadante, nos métodos usuais de sedimentação e centrifugação.

Foram examinadas 162 amostras, apresentando os seguintes resultados: 146 amostras (97%) continham os elementos histológicos característicos da polpa da fruta declarada pelo fabricante; destas últimas, 9,9% foram condenadas pela presença de fungos e 90,1% foram aprovadas, demonstrando a boa qualidade dos produtos nacionais.

DESCRITORES: sucos e néctares de fruta, características histológicas e identificação microscópica.

I N T R O D U Ç Ã O

Os métodos usuais de exame microscópico para sucos e néctares de frutas são os de sedimentação em copo cônico e os de centrifugação ¹, ². Verificamos que, em ambos, determinadas células da polpa dos frutos, que são muito leves e têm a membrana celular delgada, não sedimentam, ficando em suspensão e se perdendo durante a operação de decantação do líquido sobrenadante. O método que descrevemos a seguir é simples e permite a retenção total

dos elementos histológicos constituintes dos sucos e néctares de frutas e dos fungos contaminantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e reagentes

Copo de 1.000 ml
Vareta de vidro de 30 cm de comprimento
Vidro de relógio de 8 cm de diâmetro
Papel-filtro Whatman n.º 42 (8-12,5 cm de diâmetro)

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Funil de Büchner (8-12 cm de diâmetro)
Placas de Petri
Espátulas
Lâminas
Laminulas
Microscópio estereoscópico
Microscópio
Glicerina a 10%

Solução de cloral hidratado

Cloral hidratado	20	g
Água destilada	15	ml
Glicerina	5	ml

Dissolva e filtre.

Solução de iodo (lugol)

Iodo cristal	0,1	g
Iodeto de potássio	0,4	g
Água destilada	30	ml

Dissolva e filtre.

Método

Homogeneize a amostra no próprio recipiente de origem e transfira 200 ml para um copo de 1.000 ml.

Adicione 300 ml de glicerina a 10% e agite com o auxílio de uma vareta de vidro.

Adicione 20 gotas da solução de cloral hidratado, agite e deixe em repouso por uma hora.

Filtre através de papel-filtro Whatman n.º 42, em funil de Büchner e utilize o vácuo com a sucção muito lenta. Procure orientar a filtração no centro do papel-filtro e lave com 100 ml de glicerina a 10%. Retire cuidadosamente o papel-filtro do funil e transfira-o para uma placa de Petri contendo uma camada delgada de glicerina a 10%.

Com o auxílio de uma espátula, retire todo o sedimento do papel-filtro e transfira-o para um vidro de relógio. Adicione uma gota de glicerina a 10% e homogeneize

bem. Transfira este material para uma lâmina de vidro e adicione uma gota de glicerina a 10%. Cubra com uma laminula e examine ao microscópio.

Identifique os elementos característicos da espécie (baseando-se nas figuras da página seguinte).

Pesquise os elementos estranhos e os fungos contaminantes, adicionando uma gota de lugol à preparação e examinando novamente ao microscópio (As células amilíferas coram em azul, as de tanino, em amarelo ouro, os fungos, em amarelo escuro e as células do arilo, em amarelo).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Empregando-se o método descrito, examinamos 162 amostras de sucos e néctares de frutas (entre os que entraram para análise de rotina no Instituto Adolfo Lutz, durante o período de janeiro de 1967 a dezembro de 1971, e os que foram adquiridos no comércio). Estas amostras eram constituídas por sucos e néctares de laranja, maracujá, uva, limão, caju, abacaxi, maçã, marmelo, damasco, pêsego, *grape-fruit*, jabuticaba, tangerina, banana, pera, framboesa e manga.

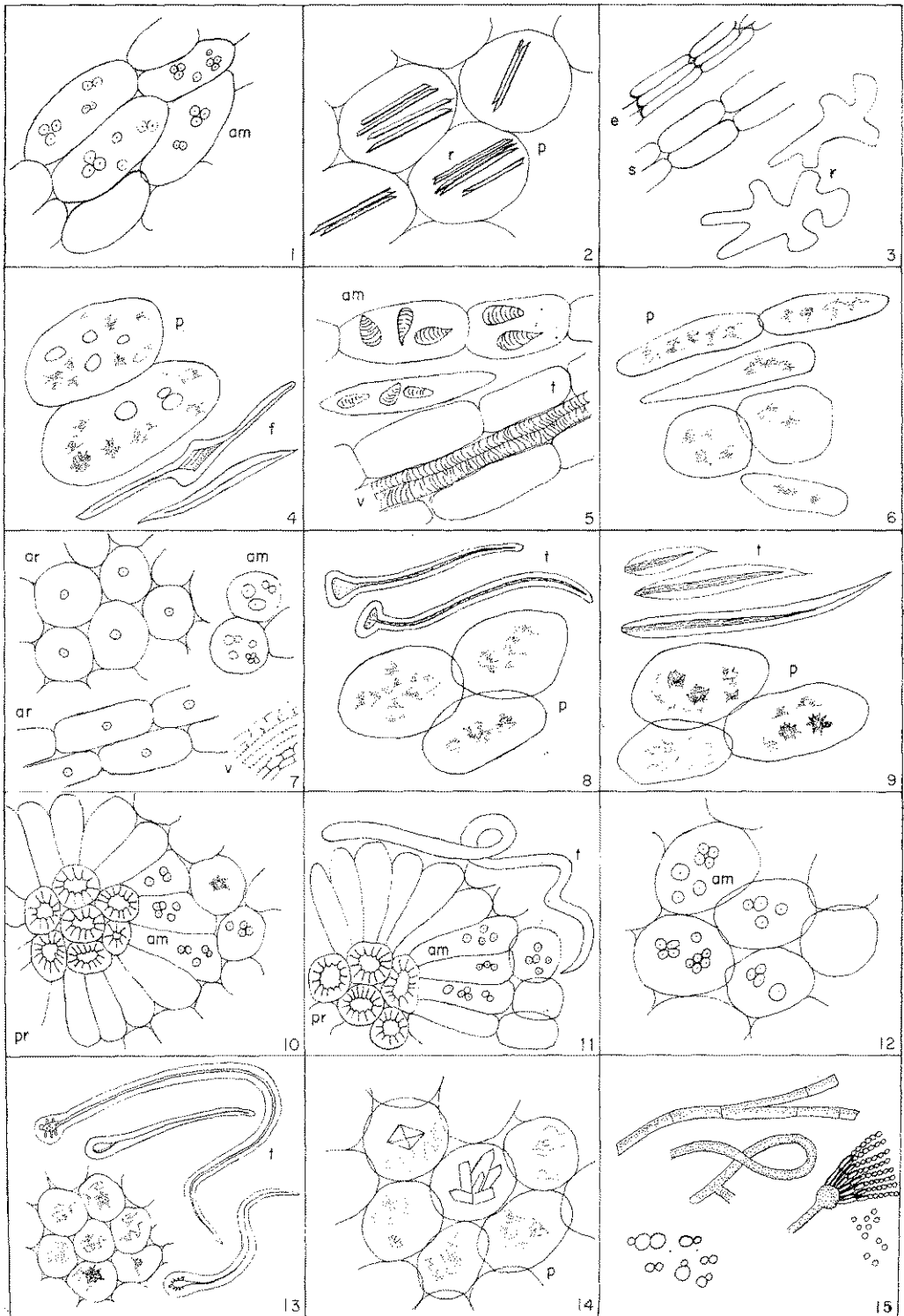
Em 5 amostras (3%), não encontramos elementos histológicos característicos das espécies vegetais que deram origem aos produtos, pois estes estavam ausentes em consequência da filtração durante o processo da fabricação.

Foram condenadas 16 amostras (9,9%) por conterem fungos e esporos em grande quantidade e foram aprovadas 146 amostras (90,1%), pois continham realmente os sucos ou néctares de frutas declarados nos rótulos.

Estes resultados permitem concluir que a produção de sucos e néctares nacionais já atingiu um razoável grau de qualidade em relação à higiene e constituição.

Características microscópicas dos sucos e néctares de frutas

- 1 — *Anacardium occidentale* (caju) — células amilíferas da polpa (am).
- 2 — *Ananas sativus* (abacaxi) — células da polpa, contendo ráfides de oxalato de cálcio.
- 3 — *Citrus* sp. (laranja, limão) — células das vesículas: epiderme (e) e subepiderme (s), células da polpa (r).
- 4 — *Mangifera indica* (manga) — células da polpa contendo cromatóforos e amido (p), fibras (f).
- 5 — *Musa* sp. (banana) — células amilíferas da polpa (am), células de tanino (t), vasos (v).
- 6 — *Myrcia jaboticaba* (jaboticaba) — células da polpa (p).
- 7 — *Passiflora* sp. (maracujá) — células do arilo (ar), células amilíferas (am), vasos espiralados (v).
- 8 — *Prunus armeniaca* (damasco) — tricomas do epicarpo (t), células da polpa (p).
- 9 — *Prunus persica* (pêssego) — tricomas do epicarpo (t), células da polpa (p).
- 10 — *Pyrus communis* (pera) — células amilíferas (am), blocos de células pétreas (pr).
- 11 — *Pyrus cydonia* (marmelo) — tricomas do endocarpo (t), células amilíferas (am), blocos de células pétreas (pr).
- 12 — *Pyrus malus* (maçã) — células amilíferas da polpa (am).
- 13 — *Rubus idaeus* (framboesa) — tricomas da epiderme (t), células da polpa (p).
- 14 — *Vitis* sp. (uva) — células da polpa contendo cristais (p).
- 15 — Fungos e esporos.



RIAL-A/394

DECÂNIO, M.V. — Method for microscopic identification of the histological componentes and search for fungi in fruit juices. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 18-22, 1974.

SUMMARY: The method is intended to provide for total retention and identification of the histological components of fruit juices and nectars, since in regular centrifugation and sedimentation methods, many of these elements are lost during the decantation of the afloat liquid. 162 samples were examined with the following results: 157 of 97% of the samples presented the histological elements which are characteristics of the fruit pulp, as declared by the product manufacturer. Out of these 157 samples, 15 or 9.9% were disapproved due to the presence of fungi and the remaining 142 or 90.1% were approved, thus demonstrating the high quality of brazilian products.

DESCRIPTORS: fruit juices, histological characteristics and microscopical identification.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. 10th ed. Washington, A.O.A.C., 1965. p. 707.
2. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD — *Normas sanitárias de alimentos*. Panamá, O.P.S., 1965.
3. Winton, A.L. & Winton, K.B. — *The structure and composition of foods*. New York, John Wiley, 1935.

Recebido para publicação em 24 de abril de 1974.

“ASPIRINA SOLÚVEL EM LISINA”: ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO *

Mário Franklin SCARPELLI **

Maria Auxiliadora CHAVES **

RIAL-A/395

SCARPELLI, M.F. & CHAVES, M.A. — “Aspirina solúvel em lisina”:
estudo espectrofotométrico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 23-27, 1974.

RESUMO: Com a finalidade de verificar a estabilidade do ácido acetil-salicílico em meio aquoso, os autores fizeram um estudo comparativo entre os espectros de absorção do ácido acetil-salicílico, do ácido salicílico e de um produto farmacêutico apresentado como solução de ácido acetil-salicílico em solução de L-lisina base, a 50% (*Polha méd.*, 66 (4): 27-33, 1973) e concluíram que o medicamento acima citado praticamente não contém “aspirina solúvel em lisina”, mas sim uma mistura de salicilato de lisina e acetato de lisina, resultante da decomposição do ácido acetil-salicílico e posterior combinação com a lisina.

DESCRITORES: ácido acetil-salicílico em solução de L-lisina base; espectrofotometria, estabilidade do ácido acetil-salicílico.

I N T R O D U Ç Ã O

É fato conhecido que o ácido acetil-salicílico é muito instável em presença de umidade, decompondo-se em ácido salicílico e ácido acético. As farmacopéias que o inscrevem admitem uma tolerância de 0,15% de ácido salicílico livre para a substância pura e 7,5% para o acetil-salicilato de alumínio ¹.

Por esta razão, causou-nos estranheza a existência de um medicamento apresentado como solução do ácido acetil-salicílico em

solução de L-lisina base (adiante referido simplesmente como “ácido acetil-salicílico solúvel em lisina”, objeto de quatro trabalhos publicados ^{2, 3, 4, 5}, quanto à avaliação antitérmica, tolerância digestiva e salicilemia). Dado o interesse despertado como novidade em farmacotécnica, passamos ao estudo de estabilidade do ácido acetil-salicílico na referida formulação.

O método que empregamos foi o espectrofotométrico, que permite com facilidade identificar o ácido salicílico e o ácido acetil-salicílico.

* Realizado no Serviço de Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Espectrofotômetro Beckman, Modelo DB
com refrigerador
Etanol neutro e isento de aldeído
Éter etílico
Ácido acetil-salicílico
Ácido salicílico
L-lisina.

Espectrofotometria

Foram empregados:

1. Ácido acetil-salicílico em etanol, 100 $\mu\text{g/ml}$, cujo espectro de absorção se lê na fig. 1:

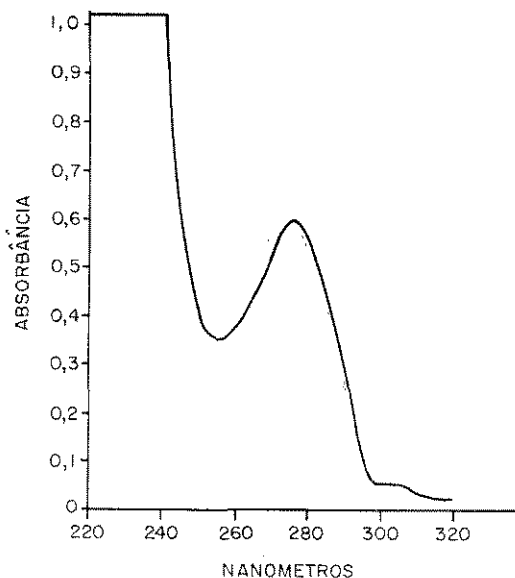


Fig. 1 — Ácido acetil-salicílico em etanol; absorvância máxima 278 nm.

2. Ácido salicílico em etanol, 30 $\mu\text{g/ml}$, conforme fig. 2:

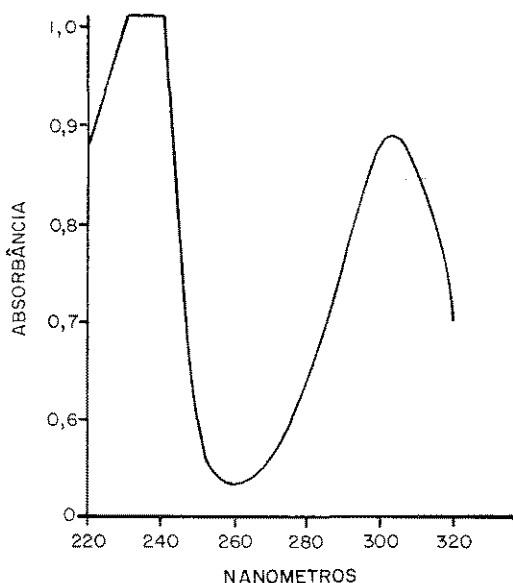


Fig. 2 — Ácido salicílico em etanol; absorvância máxima 303-305 nm.

3. 30 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico correspondente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ácido acetil-salicílico indicado no produto. (Fig. 3):

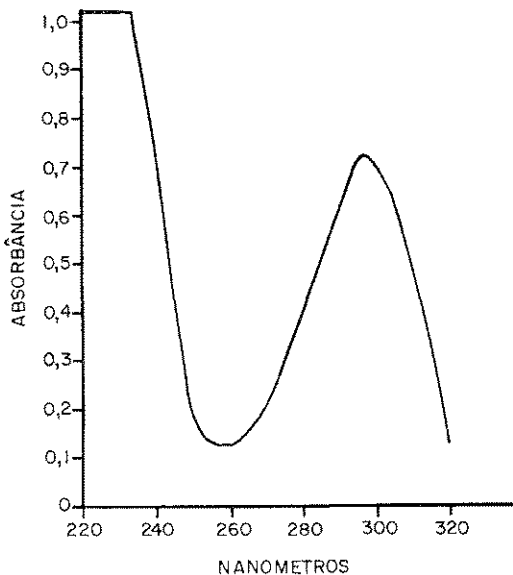


Fig. 3 — Diluição direta do produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina"; absorvância máxima 295 nm.

3. Diluição direta do produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina" na proporção de 1:5.000 em etanol com o teor de

4. Diluição preparada com 1 ml do produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina", extração em meio ácido com éter, evaporado o extrato etéreo a resíduo seco em banho-maria e diluído para 5.000 ml em

etanol, para se obter a concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico correspondente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ácido acetil-salicílico (fig. 4):

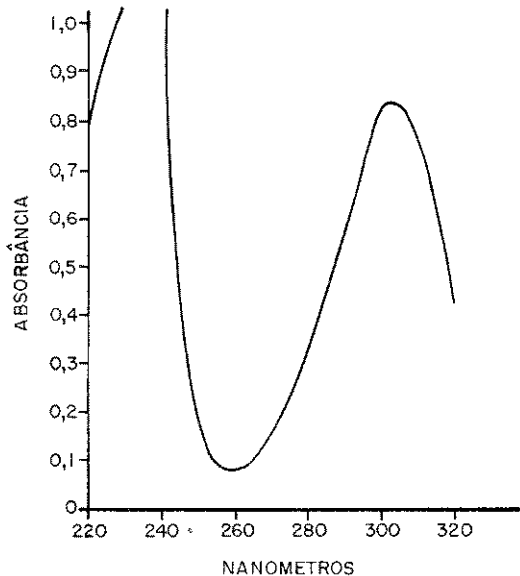


Fig. 4 — Diluição preparada com 1 ml do produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina"; absorvância máxima 303-305 nm.

5. Ácido salicílico em presença de L-lisina — solução alcoólica de ácido salicílico à qual se adicionou L-lisina na proporção indicada no produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina" (fig. 5):

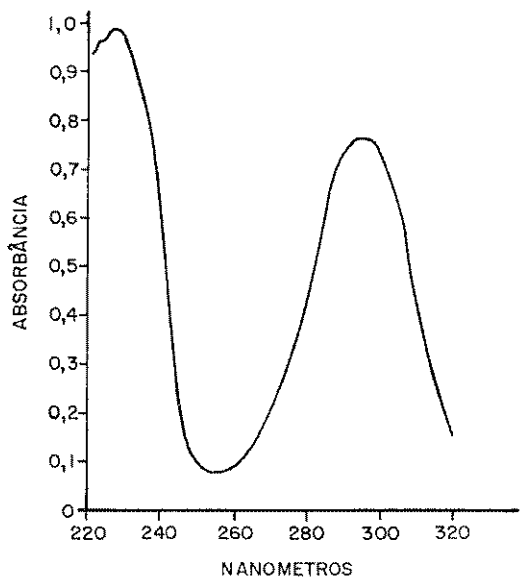


Fig. 5 — Ácido salicílico em presença de L-lisina, em solução alcoólica; absorvância máxima 295 nm.

6. Ácido acetil-salicílico em presença de L-lisina — solução alcoólica de ácido acetil-salicílico à qual se adicionou L-lisina na proporção indicada no produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina" (fig. 6 a e b):

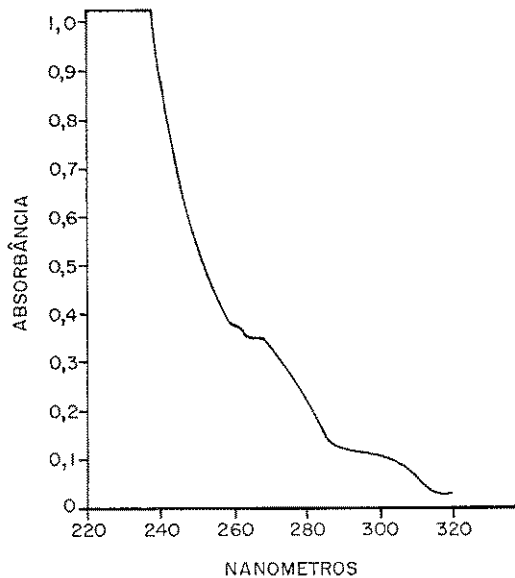


Fig. 6a — Ácido acetil-salicílico em presença de L-lisina, em solução alcoólica, recém-preparada; absorvância máxima atípica.

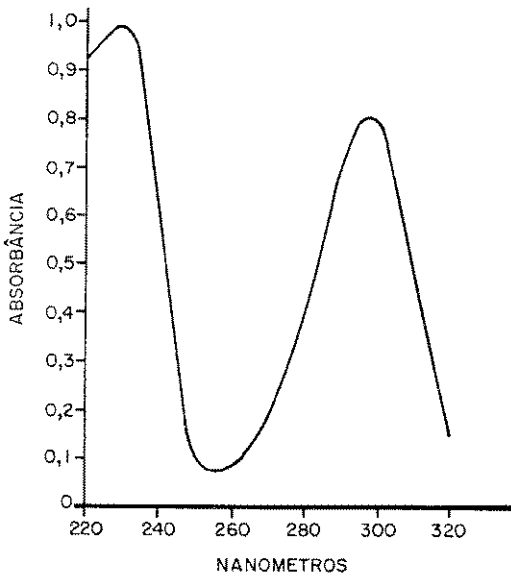


Fig. 6b — A mesma solução, após 10 minutos de aquecimento em banho-maria; absorvância máxima em 295 nm.

C O N C L U S Õ E S

1. Feita a comparação da absorbância máxima do ácido acetil-salicílico (278 nm) e do ácido salicílico (303-305 nm) com a absorbância máxima de:

- a) diluição direta do produto ácido acetil-salicílico solúvel em L-lisina base a 50% (295 nm);
- b) solução em álcool após extração com éter em meio ácido do produto "ácido acetil-salicílico solúvel em L-lisina base a 50% (303-305)nm);
- c) solução de ácido salicílico que se adicionou à L-lisina (295 nm);
- d) solução do ácido acetil-salicílico que se adicionou à L-lisina (295 nm),

verificamos que nenhuma solução apresenta absorbância máxima em 278 nm correspondente ao ácido acetil-salicílico e que as absorbâncias máximas do ácido salicílico com L-lisina (295 nm) e a do ácido acetil-salicílico com L-lisina (295 nm) são iguais, indicando a ausência do ácido acetil-salicílico.

2. Para esclarecer o desvio de 303-305 nm para 295 nm das absorbâncias máximas, efetuamos as curvas do ácido salicílico dissolvido em L-lisina e de ácido acetil-salicílico dissolvido também em L-lisina e verificamos que a L-lisina é a responsável por este desvio, embora ela isolada não apresente curva no espectrofotômetro.

3. Como conclusão final, verificamos que o artifício químico empregado para se obter ácido acetil-salicílico solúvel na preparação do produto ora em estudo não alcançou a meta desejada porque, na realidade, o que se obteve foi salicilato de L-lisina e acetato de L-lisina. Considerando que a Farmacopéia Brasileira, a Francesa, a Americana e a Britânica, que inscrevem a citada droga, não permitem a presença do ácido salicílico, livre como impureza decorrente de hidrólise, além de um certo limite, e que o National Formulary, da American Pharmaceutical Association, que inscreve o acetil-salicilato de alumínio, permite a presença de apenas 7,5% de salicilato de alumínio, concluímos que o produto "ácido acetil-salicílico solúvel em lisina", apresentando 100% de hidrólise, está absolutamente fora de qualquer tolerância permitida.

RIAL-A/395

SCARPELLI, M.F. & CHAVES, M. A. — Spectrophotometric study on "Aspirin soluble in lysine". *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 23-27, 1974.

SUMMARY: In order to determine the stability of the acetylsalicylic acid in aqueous medium a comparative study of the absorption spectra of the acetylsalicylic acid, salicylic acid and those of a pharmaceutical product presented as a solution of acetylsalicylic acid in a 50% L-lysine solution (*Folha méd.*, 66 (4): 27-33, 1973) was made.

The study showed out that the mentioned product practically does not contain "aspirin soluble in lysine" rather than a mixture of lysine salicylate and lysine acetate resulting from the decomposition of the acetylsalicylic acid with further combination with the lysine.

DESCRIPTORS: acetylsalicylic acid in L-lysine base solution; spectrophotometry, stability of acetylsalicylic acid, in L-lysine base solution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION — *National Formulary*. 13th ed. Washington, A.P.A., 1970. p. 30.
2. FONTANESI, D.; MONTI, J.S.; KLINGER, E.G. & LIMA FILHO, J. — Acetil salicílico em solução: avaliação terapêutica como antitérmico em pediatria. *Folha méd.*, 66 (6): 117-26, 1973.
3. MIRA, J.G.; LOPES, V.L.V.; CEQUINEL, L.F. & KAWASE, T. — "A. acetil-salicílico em gotas: novo produto na terapêutica infantil". (Nota prévia). *Folha méd.*, 67 (1): 129-36, 1973.
4. MORAES, A.P. — Aspirina em gotas estudo como antitérmico em pediatria. *Folha méd.*, 66 (6): 109-15, 1973.
5. PINHEIRO, G.C. & MOREIRA FILHO, J. M.L. — Aspirina solúvel em lisina: tolerância digestiva e salicilemeias. (Nota prévia). *Folha méd.*, 66 (4): 27-37, 1973.

Recebido para publicação em 28 de abril de 1974.

DETERMINAÇÃO DO SEDIMENTO, CASCAS E PAUS NO CAFÉ TORRADO E MOÍDO *

Fernando Cerviño LOPEZ **

RIAL-A/396

LOPEZ, F. C. — Determinação do sedimento, cascas e paus no café torrado e moído. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 29-34, 1974.

RESUMO: Neste trabalho foi descrito método para determinação do sedimento e cascas no café de consumo, torrado e moído. Consiste no desengorduramento parcial do material com solvente orgânico para separar o sedimento e deixar o pó solto, peneiração para livrar a amostra do pó (que não é de interesse na observação à lupa), separação das impurezas e pesagem. No cálculo final, usou-se o fator de conversão para reverter o peso encontrado em peso de impurezas no café verde.

DESCRITORES: café (torrado e moído), determinação do sedimento e cascas.

I N T R O D U Ç Ã O

O método que ora apresentamos tem por finalidade a determinação das impurezas provenientes do beneficiamento imperfeito do café que deu origem ao produto — café torrado e moído — assim como a determinação destas mesmas impurezas e de substâncias estranhas que são adicionadas ao produto, com o propósito de fraudá-lo. O objetivo na elaboração do método não foi somente a pura e simples separação e pesagem das impurezas, mas sim, na avaliação das mesmas, reproduzir com fidelidade as diversas operações pelas quais o produto passa na indústria.

As impurezas mais comuns no café torrado e moído são as oriundas do tratamento do fruto do cafeeiro, para livrar a semente de seus envoltórios.

No Brasil, as fraudes mais freqüentemente cometidas no café torrado e moído são: presença de cascas do café, paus, milho torrado, açúcar, cacau torrado, terra, areia, café esgotado etc.

A determinação de impurezas contidas em amostras de café torrado e moído é baseada em método microscópico, no qual a amostra é previamente tratada por solvente orgânico e as impurezas são separadas e pesadas. O peso obtido na determinação das cascas é multiplicado por um fator para restabelecer o peso original das mesmas, antes de torradas e moídas.

Das cascas são computados o epicarpomesocarpo e o endocarpo. O espermoderma, ou película do café, é considerado elemento natural do café torrado e moído e só é tido como fraude quando presente em quantidade excessiva.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Nessa determinação, preliminarmente, o analista deve levar em conta os caracteres organolépticos da amostra pois, conforme o caso, poderão servir de orientação. O aspecto e o aroma, por exemplo, ficam sensivelmente alterados quando a quantidade de impurezas é grande, ou quando está presente grande quantidade de café esgotado.

A homogeneização perfeita das amostras de café torrado e moído, que contém cascas, é difícil devido ao formato das partículas de cascas (chatas) e ao das partículas de café (arredondadas). Portanto, nas porcentagens baixas, onde é exigido maior rigor, quanto maior a tomada de amostra tanto mais representativa ela será.

O tratamento por solvente orgânico (clorofórmio, tricloroetileno etc.), a frio, tem por finalidade: a) retirar parcialmente o óleo e, assim, desprender o pó fino que cobre as partículas tanto do café como das impurezas; b) aumentar o contraste entre as partículas e as impurezas; as cascas do café não contém óleo mas, como no Brasil se torra excessivamente o café (torração apertada), este chega a exsudar o óleo que, por contacto, passa para as cascas, deixando-as com a mesma cor do café; c) separar o sedimento; o solvente deve ser de densidade alta para permitir a perfeita separação do sedimento.

Conforme o grau de torração e a gradação do moinho, o café e as cascas torradas oferecem maior ou menor resistência à trituração, mas sempre dão formação de partículas mais ou menos grosseiras, e de pó fino. No exame à lupa, chamamos de pó fino ao pó no qual é impossível, devido ao tamanho, separar as partículas de café das de cascas; estão, neste caso, as partículas que passam em tamis n.º 80 USBS. Portanto, a finalidade de passar a amostra em tamis n.º 80 é separar o pó fino, a fim de facilitar a catação das impurezas e evidenciar as fraudes, quando presentes.

A resolução n.º 465 do Instituto Brasileiro do Café, que rege o assunto, trata apenas da quantidade de impurezas no *café cru*, cujo limite máximo permitido é de 1% (um por cento). Para a determinação de cascas no café torrado e moído impõe-se, portanto, um fator de conversão que reverta os pesos do café torrado e das cascas

torradas em pesos de café cru e de cascas cruas.

As estruturas dos componentes das cascas — epicarpo-mesocarpo e o endocarpo — são muito diferentes, assim como o comportamento dos mesmos quanto a torração e moagem. Para se obter um fator de conversão, no caso do café, não se pode usar *qualquer* amontoado de cascas, pois seria impossível conseguir resultados concordantes. Na elaboração do método, foi usada, em cada determinação, a mesma proporção em que os componentes das cascas são encontrados no café em coco.

Os paus (pedúnculos das cerejas ou fragmentos do cafeeiro), embora sejam computados, não foram estudados, quanto ao comportamento na torração e moagem, por representarem, em milhares de amostras analisadas, menos de 10% do peso das cascas.

No café em coco, as cascas estão na seguinte proporção: 65% de epicarpo-mesocarpo e 35% de endocarpo (base seca); o epicarpo-mesocarpo tem, em média, 17% de umidade e o endocarpo, 13%. Pela torração, após retirar a umidade, o epicarpo-mesocarpo perde 28% e o endocarpo, 11%, em peso (dados obtidos torrando-se as cascas juntamente com o café).

Após a moagem, os cafés oferecidos ao consumo apresentam uma variação de 30 a 70% de pó fino (tamis n.º 80) e, nesses limites, as cascas dão a seguinte proporção de pó fino (dados obtidos moendo, em moinho industrial, as cascas juntamente com o café):

Café	Epicarpo-mesocarpo	Endocarpo
30%	34%	8%
70%	39%	10%

Pelos dados acima verificamos que a variação das cascas não é tão grande como a do café e podemos dar, como médios, os seguintes resultados: epicarpo-mesocarpo 37%, endocarpo 9%.

Somando-se todas essas perdas, conclui-se que o peso de cascas obtido na análise representa a metade do peso original (cascas cruas), daí a razão da multiplicação por 2. Da mesma forma, é necessário restabelecer também o peso da amostra. O café

cru, ao ser torrado, perde 20% de seu peso e o café torrado e moído perde 10%, no tratamento com clorofórmio. Portanto, o fator será 1,38. Simplificando os 2 termos ($2 \div 1,38$), teremos o fator final 1,45.

No caso de altas porcentagens de cascas, o fator deverá ser recalculado baseando-se nas perdas das diversas operações.

No cálculo do fator para o sedimento (1,25), leva-se em consideração apenas a perda do café na torração.

MATERIAL E MÉTODO

O material de exame é constituído por amostras de café torrado e moído, colhidas pelo Serviço de Fiscalização do Instituto Brasileiro do Café e pela Divisão de Alimentação Pública da Secretaria de Estado da Saúde — São Paulo, Brasil, para análise fiscal, e por amostras enviadas por particulares, para análises de orientação.

Preparo da amostra

Espalhe a amostra em cartolina e misture bem, com movimentos da periferia para o centro, com o auxílio de uma espátula. Divida em 4 partes, fazendo 2 cortes perpendiculares, e misture 2 a 2 os quadrantes diametralmente opostos. Junte as 2 metades e misture novamente. Observe os caracteres organolépticos, pois poderão servir de orientação para a análise.

Tratamento com clorofórmio

Material

Espátula de aço inoxidável
Lâmina de 12 x 2 cm
Colher de osso, com capacidade de 2 g aproximadamente
Cálice cônico de 75 ml
Cilindro graduado de 100 ml
Placa de Petri de 10 x 2 cm
Funil de 7 cm
Pincel de pelo de marta
Papel-filtro qualitativo
Tubo de ensaio de 24 x 2 cm
Estufa a 50°C

Reagente

Clorofórmio

Procedimento

Retire a amostra por intermédio de uma colher de osso e passe a espátula nos bordos para nivelar a superfície (peso aproximado da amostra: 2 g). Em capela, transfira a amostra da colher para um cálice cônico contendo 60 ml de clorofórmio. Com a extremidade de um bastão de vidro, revolva, vagarosamente, a camada formada pelo pó de café, observando se há precipitação de sedimento (areia, torrões, pedras, terra, cristais de açúcar etc.). Em seguida, agite, com o bastão de vidro, todo o conteúdo do cálice, deixando a mistura de pó de café e clorofórmio em contacto, durante 20 minutos. Transfira a mistura para um funil com papel-filtro. O café aderente às paredes do cálice, após evaporação do clorofórmio, é também transferido para o funil com auxílio de um pincel. Após filtração, transfira o papel-filtro com o pó de café para uma placa de Petri e coloque em uma estufa a 50°C, durante uma hora. Deixe esfriar e, com o auxílio de espátula, retire o pó do papel para a placa e homogeneíze-o.

Sedimento

Material

Balança
Espátula de aço inoxidável
Cálice cônico de 75 ml
Cilindro graduado de 100 ml
Bastão de vidro
Kitasato, 500 ml, com rolha atravessada por tubo de vidro em forma de sifão
Papel-filtro qualitativo
Estufa a 50°C
Pincel de pelo de marta
Pesa filtro de 12 ml
Dessecador com cloreto de cálcio, anidro
Lupa (aumento 20 X)
Lâmina de vidro de 76 x 26 mm

Reagente

Clorofórmio

Procedimento

Constatada a presença de sedimento, pese 2 g da amostra homogeneizada e use, inicialmente, a mesma técnica já descrita

no *Tratamento com clorofórmio*, revolvendo com cuidado a camada de café até não haver mais precipitação do sedimento. Por intermédio de um sifão de vidro, ligado em um Kitasato, retire, usando vácuo e papel-filtro, a camada de café sobrenadante e as partículas aderentes às paredes. Decante a maior parte do clorofórmio do cálice, deixando aproximadamente 5 ml, tendo o cuidado de não arrastar o sedimento. Coloque o cálice na estufa a 50°C para evaporar o clorofórmio restante. Com o auxílio de um pincel, transfira o sedimento para um pesa-filtro previamente seco em estufa, esfriado em dessecador e pesado. Seque em estufa a 50°C durante uma hora. Deixe esfriar em dessecador e pese. Transfira o sedimento para lâmina e examine em lupa (aumento 20 X) a natureza do sedimento.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P \times 1,25} = \text{sedimento por cento (café cru)}$$

$N = \text{n.º de g do sedimento}$
 $P = \text{n.º de g da amostra}$
 $1,25 = \text{fator de conversão do peso de café torrado e moído em peso de café cru}$

Análise prévia

Como a grande maioria das amostras recebidas para análise é constituída de cafés próprios para o consumo, convém que seja feito um exame prévio no pó, tratado pelo clorofórmio, antes de prosseguir na análise, a fim de que seja evitada perda de tempo.

Exame prévio — Junte, na parede da placa, a amostra de 2 g de pó de café tratado pelo clorofórmio, homogeneize-a e retire, com a ponta da espátula, uma porção equivalente a 0,2 g, aproximadamente, transferindo-a para a tampa da placa. Espalhe em camada fina e observe em lupa com aumento 20 X. Mude de posição as partículas de pó, quantas vezes forem necessárias, para que a observação seja completa. A presença de 1 ou 2 fragmentos pequenos de cascas e paus indica que o pó de café é perfeitamente normal, pois essa quantidade

não atingirá o limite de 1% (levando em consideração o sedimento, evidentemente).

O analista deverá estar suficientemente preparado para saber, pela observação do sedimento e exame à lupa, se deverá prosseguir ou não com a análise.

No exame prévio, o analista deverá observar, além das impurezas do café, as substâncias estranhas, como feijão, milho etc.

Separação das cascas e paus

Quando, pelo exame prévio e pelo sedimento formado, for observado que a amostra poderá conter 1% ou mais de impurezas, proceder-se-á à separação das cascas e paus pela técnica seguinte:

Material

Balança, 4.º decimal
Tamis n.º 80, USBS
Placa de Petri
Lupa (aumento 20 X)
Agulha de platina (cabo de Kolle)
Lâmina de vidro (76 x 26 mm)
Papel-filtro
Estufa a 105°C
Pincel de pelo de marta
Pesa-filtro de 12 ml
Dessecador com cloreto de cálcio, anidro

Procedimento

Homogeneize o pó de café tratado pelo clorofórmio e pese de 0,1 a 0,5 g (a quantidade da amostra será inversamente proporcional à quantidade provável de impurezas observadas no exame prévio). Transfira para um tamis n.º 80 e, com o auxílio de um pincel, separe delicadamente o pó que passa pelos crivos até não dar mancha sobre uma folha de papel branca.

Transfira o resíduo do tamis para a tampa da placa de Petri. Espalhe as partículas e, em lupa aumento 20 X, com uma agulha de platina, seca, separe dos grânulos de café as partículas de cascas e paus, agrupando-as em área livre da placa. Coloque uma gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro e transporte as cascas e paus, agrupados na placa, para a gota de água.

Esta operação é feita molhando a ponta da agulha, a fim de se conseguir a aderência necessária. Revolva a amostra e repita a operação quantas vezes forem necessárias, até que todos os fragmentos de cascas e paus tenham sido transferidos para a gota de água. Retire o excesso de água sobre a lâmina, por absorção, com papel-filtro. Leve a lâmina à lupa e separe das cascas e paus os grânulos de café que foram, por acaso, arrastados pela agulha molhada. Transfira as cascas e paus para um pesa-filtro, previamente aquecido em estufa a 105°C, esfriado em dessecador e pesado. Coloque o pesa-filtro em estufa a 105°C, durante 1 hora, deixe esfriar em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{N \times 1,45 \times 100}{P} = \text{cascas e paus por cento (café cru)}$$

N = n.º de g de cascas e paus

P = n.º de g da amostra

1,45 = fator de conversão do peso do café torrado e moído e das cascas torradas e moídas em peso de café cru e cascas cruas.

Determinação do total das impurezas

O total das impurezas por cento é o resultado da soma das porcentagens do sedimento e das cascas e paus. Quando for

muito próximo de 1%, convém repetir a análise e dar, como resultado final, a média dos totais obtidos.

Para determinação quantitativa de fraudes, como as cometidas com feijão, milho etc., o processo é o mesmo, variando apenas o fator de conversão de peso da substância torrada e moída em peso da substância crua, que deverá ser determinado para cada caso.

R E S U L T A D O S

O número de amostras analisadas pelo método que ora apresentamos e que está sendo usado pela Seção do Café do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, e os resultados obtidos, estão indicados na tabela abaixo:

Até dezembro de 1971, o Instituto Brasileiro do Café forneceu a totalidade do café consumido pelas torrefações a um preço, aproximadamente, 75% abaixo do preço normal do mercado. A partir daquela data, o IBC fornece uma quota correspondente a 60% do consumo, a um preço 60% abaixo do preço normal do mercado.

Pela tabela abaixo, caso seja suspenso o subsídio do IBC, é de se prever que o índice condenatório suba sensivelmente.

Tabela estatística das amostras examinadas de café torrado e moído

Ano	Amostras			Porcentagem Amostras condenadas
	Condenadas	Aprovadas	Total	
1969	7	3.309	3.316	0,21
1970	74	2.311	2.385	3,1
1971	85	3.987	4.072	2,0
1972	120	3.102	3.222	3,7
1973	368	2.680	3.048	12,1

RIAL-A/396

LOPEZ, F.C. — Detection of sediment and peels in roasted ground coffee. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 29-34, 1974.

SUMMARY: A method to detect sediment and peels in common ground coffee is described in this work. The method consists in the partial defatting of material by using an organic solvent agent, in order to separate the sediment from the coffee powder, thus, causing the latter to get loose-grained; sifting of material to discard the coffee powder which is not interesting for observation through a magnifier; separation and weighing of impurities.

In final calculation, a correction factor was used to convert the weight obtained for roasted coffee into that applying for raw coffee.

DESCRIPTORS: Coffee (roasted and ground), detection of sediment and peels.

Recebido para publicação em 10 de maio de 1974.

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRITOS E NITRATOS EM SAIS DE CURA *

Walkyria H. LARA **
Mickiko Y. TAKAHASHI **

RIAL-A/397

LARA, W.H. & TAKAHASHI, M.Y. — Determinação espectrofotométrica de nitritos e nitratos em sais de cura. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 35-39, 1974.

RESUMO: Foi aplicado um método espectrofotométrico para determinação de nitrito e nitrato de sódio, em sais de cura. Baseia-se nas observações de Wetters & Uglum (1970) de que a razão entre as absorvâncias da solução aquosa de nitrito de sódio a 355 e a 302 nm é constante e igual a 2,5 e que nitrato de sódio não absorve a 355 nm, mas tem uma banda característica a 302 nm. O fato de não haver interferência de íons cloreto nestas relações torna o processo apropriado ao controle analítico de nitrito e nitrato em sais de cura, simples, com a vantagem de ser direto.

Trinta amostras conhecidas foram analisadas e os resultados, comparados aos obtidos pelos métodos clássicos, mostraram boa correlação.

DESCRITORES: nitrato, nitrito, determinação espectrofotométrica; sais de cura, determinação de nitrato e nitrito.

INTRODUÇÃO

O uso de nitrato em *cura* de carnes é bastante antigo e talvez esteja ligado ao tempo da introdução do salitre e da pólvora na Europa, por volta de 1300. Bem mais recentes são as investigações de Haldane em 1901, mostrando que o nitrato é reduzido a nitrito e é este o responsável pela reação com a hemoglobina, produzindo a desejada coloração das carnes curadas, sendo também agente bacteriostático. Por isso, passou-se a empregar diretamente nitritos nos *sais de cura*, mantendo-se, entretanto, uma parte de nitrato, por assegurar

a manutenção de um nível de nitrito por mais tempo.

Os *sais de cura* são misturas de sal (cloreto de sódio) e nitritos e nitratos, de sódio ou de potássio. São aplicados diretamente nas carcaças ou usados em soluções a 25% nas quais as carcaças são mergulhadas. Mais recentemente são feitas injeções desta solução nas paletas e pernis a serem curados. Com a introdução de novos aditivos na tecnologia de alimentos, há hoje uma grande variedade de sais de cura associados a estabilizantes (polifosfatos) açúcares (glicose, sacarose) e ácido ascórbico.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Investigações sobre nitrosaminas e suas possibilidades carcinogênicas ^{8, 9}, levaram ao estudo da formação de nitrosaminas a partir de nitritos e aminas secundárias em condições semelhantes às do estômago de mamíferos ⁵. Outra possibilidade é a formação de nitrosaminas no próprio alimento, investigações que estão sendo realizadas^{3,10}, mas a metodologia para este tipo de análise é altamente sofisticado e os resultados não são ainda suficientes para conclusões sobre o assunto. Em excelente revisão, SEBRANEK & CASSENS ¹¹ chegam à conclusão de que não se pode excluir o uso de nitritos e nitratos pelas informações atuais, à vista dos riscos dessa exclusão, pois os nitritos têm a capacidade de impedir o desenvolvimento de toxinas do *Clostridium botulinum* nas conservas enlatadas.

Há outras razões para se limitar as quantidades de nitratos ingeridos, principalmente por crianças, pois a baixa acidez do estômago das mesmas facilita a transformação de nitrato em nitrito (por bactérias) que, absorvido, age sobre a hemoglobina, causando metahemoglobinemia (oxidação de ferro da hemoglobina ao estado de ferro III) que impede que esta exerça a função normal de transportar oxigênio. Esta correlação foi estabelecida por volta de 1950 por Rosenfield & Huston e uma boa revisão foi feita por LEE ⁷, em 1970.

De outro lado, o controle das quantidades de nitrito e nitrato usadas nos sais de cura é da maior importância e apresenta problemas analíticos. O método clássico para determinação de nitrito (Griess Ylosvay) é sensível e de fácil execução; apresenta, entretanto, a desvantagem de usar alfa-naftilamina, um reagente com o qual devem ser tomadas precauções por ser cancerígeno. Para a determinação de nitrato com ácido fenoldissulfônico pelo método introduzido por Sprengel que, após as investigações de Chamot *et alii*, se estabeleceu amplamente, há necessidade de retirada dos íons cloro mediante a precipitação

com íons de prata, um processo trabalhoso e demorado ⁶.

Os métodos baseados na redução do nitrito à amônia só dão resultados para macroquantidades. A redução a nitrito, seguida de diazotização, exige agentes redutores bastante uniformes e um grande controle do processo pois, no caso de zinco, cloreto interfere; no uso de cádmio ou cádmio-cobre, valores muito baixos são encontrados pela redução do nitrato a um estado mais baixo que o nitrito ^{1, 2, 4}.

WETTERS & UGLUM ¹² estudaram os espectros de absorção, na região do ultravioleta, de soluções de nitrato e nitrito, estabelecendo relações entre as bandas características de ambas. Encontraram uma razão igual a $2,5 \pm 0,02$ para as absorbâncias da solução aquosa de nitrito de sódio, a 355 nm e a 302 nm. Como nitrato de sódio não absorve a 355 nm, mas tem uma banda característica a 302 nm, pode-se calcular seu valor diminuindo-se do valor total, a 302 nm, o quociente da divisão da absorbância encontrada a 355 nm por 2,5, quando medidas as absorbâncias de uma mistura de nitrato e nitrito de sódio, a um pH acima de 5.

Procuramos aplicar estas relações e estabelecer método para dosagem de nitratos e nitritos, em presença de cloreto de sódio, nos sais de cura, não só pela facilidade que o mesmo oferece como pelo fato de íons cloreto não interferirem nas medidas. Inicialmente estudamos sais de cura simples, pois são estes os casos mais adequados. Para os produtos de carnes curadas faz-se necessária a preparação de extratos límpidos e a remoção de interferências providas do material protéico e outras.

MATERIAL E MÉTODO

Trinta amostras de sais de cura foram preparadas, com teores variáveis de nitrito e nitrato de sódio, segundo a tabela 1:

TABELA 1

Composição das amostras de sais de cura analisadas

Amostras	NaCl	NaNO ₂	NaNO ₃
n.º	%	%	%
01	99,4	0,10	0,50
02	99,4	0,50	0,10
03	98,5	1,00	0,50
04	99,0	0,20	0,80
05	98,5	0,50	1,00
06	98,0	0,80	1,20
07	98,1	0,40	1,50
08	96,8	1,20	2,00
09	96,7	0,80	2,50
10	95,5	1,50	3,00
11	96,9	2,10	1,00
12	97,5	0,50	2,00
13	98,8	0,60	0,60
14	96,7	0,80	2,50
15	97,3	1,20	1,50
16	97,5	2,00	0,50
17	97,8	1,00	1,20
18	98,7	0,50	0,80
19	98,0	1,50	0,50
20	95,9	2,50	1,60
21	99,20	0,50	0,30
22	99,00	0,50	0,50
23	98,20	1,00	0,80
24	99,00	0,40	0,60
25	97,50	1,50	1,00
26	97,60	1,20	1,20
27	97,80	0,80	1,40
28	97,75	0,55	1,70
29	97,70	0,50	1,80
30	97,20	0,80	2,00

Essas amostras foram analisadas para a determinação de nitritos e nitratos, pelo método proposto, comparativamente aos métodos de alfa-naftilamina (nitritos) e do ácido fenol dissulfônico (nitratos), como segue:

Aparelho — Espectrofotômetro U. V. e visível, com células de quartzo de 1 cm*.

Soluções padrão

a) *Solução padrão de nitrito de sódio*: Pesar 1 g de NaNO₂, com precisão de 0,001, e diluir a 100 ml em balão volumé-

trico com água. Diluir alíquotas desta solução de maneira a ter concentrações entre 0,025 e 0,2 g por cento. Fazer as leituras correspondentes a 355nm, usando água como branco.

Construir a curva padrão usando os valores das absorvâncias correspondentes.

b) *Solução padrão de nitrato de sódio*: Pesar 1 g de NaNO₃, com precisão de 0,001, e diluir a 100ml em balão volumétrico com água. Diluir alíquotas desta solução de maneira a ter concentrações entre 0,1 e 1,0 g por cento. Fazer as leituras correspondentes a 302 nm, usando água como branco.

Construir a curva padrão usando os valores das absorvâncias correspondentes.

Procedimento

Pesar, com aproximação de 0,001, 20 g de sal de cura. Diluir a 100 ml em balão volumétrico com água. Fazer a leitura em célula de 1 cm, a 302 nm e 355 nm, usando água como branco. Repetir o procedimento a partir de 10 g da amostra, se as leituras não coincidirem na curva padrão.

Cálculo

a) Com o valor da absorvância encontrada a 355 nm, procurar a concentração correspondente ao nitrito de sódio na curva padrão de nitrito de sódio (A).

b) Dividir o valor da absorvância a 355 nm por 2,5 e subtrair este resultado do valor encontrado a 302 nm.

Procurar na curva padrão de nitrato o valor correspondente a essa diferença (B).

c) Relacionar, pela fórmula abaixo, ao peso (P) da amostra empregada na determinação:

$$\frac{100 \times A}{P} = \text{nitrito, em nitrito de sódio por cento}$$

$$\frac{100 \times B}{P} = \text{nitrito, em nitrito de sódio por cento}$$

* Hitachi-Perkin-Elmer, Coleman 139.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Comparando os valores obtidos para nitritos com os valores pareados das amostras e os determinados pelo método da alfa-naftilamina (tabelas 2 e 3), verificou-se altíssima correlação ($r = 1,00$ e $r' = 0,99$, respectivamente). Para nitratos, a comparação dos valores obtidos, em confronto com os das amostras e com os determinados pelo método do ácido difenoisulfônico, acusou alta correlação ($r'' = 0,99$ e $r''' = 0,98$).

TABELA 2

Valores obtidos na determinação de nitritos, pelo método clássico e pelo método proposto

Amostra	NaNO ₂	Método alfa-naftilamina	Método Proposto
n.º	%	%	%
01	0,10	0,09	0,12
02	0,50	0,46	0,57
03	1,00	1,07	1,02
04	0,20	0,20	0,22
05	0,50	0,49	0,54
06	0,80	0,82	0,85
07	0,40	0,47	0,45
08	1,20	1,26	1,32
09	0,80	0,82	0,80
10	1,50	1,60	1,50
11	2,10	2,30	2,15
12	0,50	0,55	0,53
13	0,60	0,65	0,57
14	0,80	0,90	0,83
15	1,20	1,35	1,30
16	2,00	1,90	2,12
17	1,00	1,10	1,05
18	0,50	0,57	0,52
19	1,50	1,64	1,54
20	2,50	2,74	2,56
21	0,50	0,57	0,56
22	0,50	0,47	0,52
23	1,00	1,10	1,00
24	0,40	0,46	0,44
25	1,50	1,65	1,60
26	1,20	1,15	1,21
27	0,80	0,90	0,85
28	0,55	0,58	0,60
29	0,50	0,55	0,55
30	0,80	0,87	0,85

TABELA 3

Valores obtidos na determinação de nitratos, pelo método clássico e pelo método proposto

Amostra	NaNO ₃	Método Ácido dife- noisulfônico	Método Proposto
n.º	%	%	%
01	0,50	0,63	0,52
02	0,10	0,09	0,09
03	0,50	0,54	0,45
04	0,80	0,92	0,82
05	1,00	0,85	1,05
06	1,20	1,16	1,20
07	1,50	1,54	1,32
08	2,00	2,16	1,95
09	2,50	2,40	2,20
10	3,00	3,36	3,00
11	1,00	0,86	0,95
12	2,00	2,04	1,85
13	0,60	0,56	0,60
14	2,50	2,40	2,35
15	1,50	1,44	1,40
16	0,50	0,54	0,35
17	1,20	1,06	1,15
18	0,80	0,78	0,75
19	0,50	0,68	0,45
20	1,60	1,60	1,50
21	0,30	0,32	0,30
22	0,50	0,46	0,45
23	0,80	0,71	0,80
24	0,60	0,56	0,60
25	1,00	0,94	1,00
26	1,20	1,10	1,25
27	1,40	1,28	1,35
28	1,70	1,60	1,55
29	1,80	1,92	1,70
30	2,00	2,08	1,95

Como conclusão, o método espectrofotométrico direto proposto oferece vantagens sobre os métodos clássicos pela maior facilidade de sua execução e pela sua exatidão.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Dr. José Lopes Neto pela análise estatística dos valores encontrados, a fim de estabelecer as correlações existentes, neste trabalho.

RIAL-A/397

LARA, W.H. & TAKAHASHI, M.Y. — Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in curing brines. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 35-39, 1974.

SUMMARY: A direct spectrophotometric method for detecting sodium nitrites and nitrates in curing brines is presented. The method is based on Wetter's and Uglum's observations (1970) by which a) there is a ratio between the absorbance rate of sodium nitrite aqueous solution at 355 nm and that at 302 nm, which is constant and equal to 2.5; b) sodium nitrate has no absorbance at 355 nm although it has a well characterised band at 302 nm. The fact that no interference chlorine ions comes up in these relations turns out this process very suitable for the analysis control of sodium nitrites and nitrates in curing brines.

Thirty known samples were analysed and the results compared with those obtained through classic methods, showing good correlation.

DESCRIPTORS: nitrate, nitrite, spectrophotometric determination; curing brines, nitrate and nitrite determination.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRABSON, J.A. & BURCH JR., W.G. — Reduction of nitrates in acid medium with Raney catalyst powders. *J. Ass. off. agric. Chem.*, 47: 1035-40, 1964.
2. ELLIOTT, R.J. & PORTER, A.G. — A rapid cadmium reduction method for the determination of nitrate in bacon and curing brines. *Analyst* (Lond.), 96: 522-7, 1971.
3. FAZIO, T.; WHITE, R.H. & HOWARD, J. W. — Analysis of nitrite and/or nitrate — processed meats for N-nitrosodimethylamine. *J. Ass. off. agric. Chem.*, 54: 1157-9, 1971.
4. FOLLETT, M.J. & RATCLIFF, P.W. — Determination of nitrite and nitrate in meat products. *J. Sci. Fd Agric.*, 14: 138-44, 1963.
5. HAWKSWORTH, G. & HILL, M.J. — The formation of nitrosamines by human intestinal bacteria. In: MEETING OF THE BIOCHEMICAL SOCIETY, 511 th, London, 1970. *Proceedings*. London, 1971. Apud *Biochem. J.*, 122: 28p-29p, 1971.
6. HORA, F.B. & WEBBER, P.J. — A source of serious error in the determination of nitrates by the phenoldisulphonic acid method and its remedy. *Analyst* (Lond.), 85: 567-9, 1960.
7. LEE, D.H.K. — *Environmental review n.º 2. Nitrates, nitrites, and methemoglobinemia*. North Carolina, Research Triangle Park, 1970.
8. LIJINSKI, W. & EPSTEIN, S.S. — Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature* (Lond.), 225: 21-23, 1970.
9. MAGEE, P.N. & BARNES, J.M. — Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.*, 10: 163-246, 1967.
10. PANALAKS, T.; IYENGAR, J.R. & SEN, N.P. — Nitrate, nitrite, and dimethylnitrosamine in cured meat products. *J. Ass. off. agric. Chem.*, 56: 621-5, 1973.
11. SEBRANEK, J.G. & CASSENS, R.G. — Nitrosamines: a review. *J. Milk Fd Technool.*, 36: 76-91, 1973.
12. WETTERS, J.H. & UGLUM, K.L. — Direct spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate in the ultraviolet. *Analyt. Chem.*, 42: 335-40, 1970.

Recebido para publicação em 15 de maio de 1974.

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO SULFATO DE NEOMICINA EM MEDICAMENTOS, DIRETAMENTE E APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA *

Waldomiro PREGNOLATTO **
Myrna SABINO **

RIAL-A/398

PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Determinação espectrofotométrica do sulfato de neomicina em medicamentos, diretamente e após separação por cromatografia em camada delgada. *Rev. Ins. Adolfo Lutz*, 34: 41-46, 1974.

RESUMO: Usando-se a reação da neomicina com ninhidrina em meio glicérico, em condições pré-estabelecidas, pode-se determinar rapidamente o teor de neomicina em um medicamento que a contenha. O método baseia-se na reação de neomicina com um reagente ninhidrina contendo glicerina: nestas condições, a reação é mais sensível e os resultados são reproduzíveis. A Lei de Beer é obedecida entre 4 e 40 μg de sulfato de neomicina por ml.

Alguns interferentes foram estudados. Quando necessário uma prévia separação da neomicina antes da reação, um método de separação por cromatografia em camada delgada foi aplicado.

DESCRITORES: sulfato de neomicina, determinação em medicamentos; cromatografia em camada delgada e espectrofotometria, na determinação do sulfato de neomicina.

I N T R O D U Ç Ã O

Para facilitar a análise de rotina de medicamentos contendo sulfato de neomicina, outro sal ou a base livre, estudamos e desenvolvemos um método baseado na reação da neomicina com ninhidrina, antes ou depois de sua separação, por cromatografia em camada delgada, de outros componentes que possam interferir nesta reação.

A neomicina e seus sais reagem com diversas substâncias, formando compostos coloridos que podem ser usados em sua determinação; assim é que furfural, p-bromoanilina¹³, orcino⁸, floroglucino³, foram já usados em tentativas na determinação da neomicina. A ninhidrina foi pela primeira vez usada, numa tentativa para determinar neomicina, por LARBRE & DORCHE⁸, num estudo comparativo quando usou também

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

para o mesmo fim uma solução de furfural; este método é em si trabalhoso e pouco específico.

Muitos outros autores estudaram a reação da neomicina com a ninhidrina e muitas técnicas foram descritas ^{1, 4, 7, 11, 14}.

No método que agora descrevemos, o reagente foi preparado em presença de glicerina, o que tornou a reação bem mais sensível e quantitativamente reproduzível.

Nos casos de medicamentos contendo outros antibióticos, como polimicina, viomicina, bacitracina, penicilina, tirotricina, é necessário inicialmente separar a neomicina daquelas substâncias. Diversos autores tentaram essa separação através de técnicas cromatográficas em coluna ¹³ e em coluna de resina — troca iônica ¹⁰, em camada delgada ^{3, 6}, em papel ^{5, 11, 14} e por cromatografia em fase gasosa ¹². Ainda, LIGHTBOWN & ROSSI⁹ estudaram a separação da bacitracina, polimicina B e neomicina, usando electroforese em ágar-gel. BRAMMER & HEMSON² usaram, para separar polimicina B e neomicina, electroforese em acetato de celulose com tampão barbitúrico 0,07 M (pH 8,6).

Uma técnica simples de separação da neomicina por cromatografia em camada delgada também é descrita, técnica essa onde não há preocupação na separação das diferentes neomicinas, por não apresentar qualquer interesse neste caso: o cromatograma é desenvolvido com butanol — ácido acético — água — trietanolamina 30% (30:22:38:10). O sulfato de neomicina é eluído com água.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram utilizados:

Ninhidrina p. a.

Cloreto de sódio * p.a.

Glicerina p.a.

Sílica gel para cromatografia em camada delgada **

Hidróxido de sódio p.a.

Sulfato de neomicina p.a.

* Backer

** Merck

Solvente

Butanol — ácido acético — água — trietanolamina 30% (30:22:38:10)

Equipamento para cromatografia em camada delgada — espectrofotômetro Beckmann DU

Reagente

Ninhidrina	1g
NaCl	26,5 g
NaOH (0,4%)	10 ml

Diluir a 100 ml com glicerina 60%.
Acertar o pH = 7,9 com NaOH diluído.
Guardar em geladeira.

Método

a) Curva padrão

Dissolva 20 mg de sulfato de neomicina, exatamente pesados, em 100 ml de água; 1 ml dessa solução contém 200 µg de sulfato de neomicina. A partir dessa solução, prepare diluições convenientes com até 20 µg de sulfato de neomicina por ml.

Reação: em tubos de ensaio, adicione 1 ml do padrão a 1 ml do reagente; esfrie em banho de gelo; adicione 3 ml de água, homogeneíze. Leia em espectrofotômetro a 570 nm.

b) Aplicação em medicamentos

No caso de forma medicamentosa líquida, dilua em água uma alíquota da amostra de maneira que a solução final contenha ao redor de 100 µg de neomicina por ml; em se tratando de pomadas, transfira uma alíquota da amostra para balão volumétrico, junte água, agite fortemente por alguns minutos, complete o volume, homogeneíze e filtre. Em ambos os casos, transfira 1 ml da solução para o tubo de ensaio e continue como em *curva padrão*, a partir do ponto: 1 ml do reagente. Dos resultados de absorbância obtidos, calcule a concentração com o auxílio da curva padrão.

c) Cromatografia em camada delgada

Cromatografe em placas de 20 x 20 cm, com camadas de sílica gel de 0,400 cm secadas ao ar por 30 minutos e ativadas em estufa a 105°C, por 2 horas.

Transfira para a placa exatamente 50 μ l do padrão e uma alíquota da amostra que contenha teoricamente 10 μ g do antibiótico e desenvolva o cromatograma com butanol — ácido acético — água — trietanolamina 30% (30:22:38:10), até a altura de 10 cm da base, seque ao ar. Revele com ninhidrina, 0,4% em acetona 95%. Aqueça em estufa a 105°C por 30 minutos, mancha azul a um Rf de 0,56. Raspe as camadas de sílica gel da placa e elua separadamente, em exatamente 2 ml de água, por contacto, durante 30 minutos. Filtre, lave o resíduo com exatamente mais 2 ml de água, recolhendo o filtrado e água de lavagem em frasco apropriado.

Leia a absorbância de ambas as soluções a 570 nm, usando como branco água previamente tratada com sílica.

Cálculo

$$\frac{Aa \times 100}{Ap} = \% \text{ do sulfato de neomicina no produto}$$

Aa = absorbância da amostra

Ap = absorbância do padrão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método é simples, reproduzível, realizável em qualquer laboratório.

A Lei de Beer é obedecida nas condições estabelecidas no método (conforme fig. 1).

Cuidado especial deve ser tomado, na preparação do reagente, em relação ao NaCl; diversas marcas foram testadas e o único NaCl que funcionou satisfatoriamente foi o Backer p.a.

Os experimentos feitos com o reagente preparado somente com água não deram

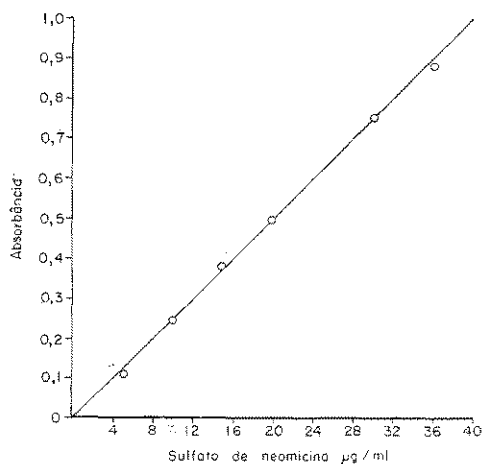


Fig. 1 — Curva padrão para determinação da neomicina

resultados satisfatórios, por apresentar o reagente pouca sensibilidade e os resultados não serem reproduzíveis.

A figura 2 mostra o espectro de absorção do produto final da reação, usando reagente com e sem glicerina. Dois máximos são sempre observados: um, a 570 nm e outro, a 400 nm. Nossas leituras foram sempre feitas a 570 nm.

Experimentos foram feitos com variação de pH 5,0 e 9,0. A reação funcionou perfeitamente em pH = 7,9.

A cromatografia em camada delgada é simples e prática: diversos solventes descritos na literatura e por nós elaborados foram testados, destacando-se, entre eles, n-butanol — ácido acético — água — piridina (30:22:38:6)¹⁴; amônio 3% — acetona (160:40)⁶; n-butanol — ácido acético — água — trietanolamina (30:20:30:20); n-butanol — ácido acético — água — trietanolamina (30:20:39:1); etanol 80%. Nenhum destes se revelou tão atisfatório como o usado e descrito.

A cromatografia em papel ascendente, usando n-BuOH — água — ácido acético (30:13:8)¹⁴, também não apresentou resultados satisfatórios.

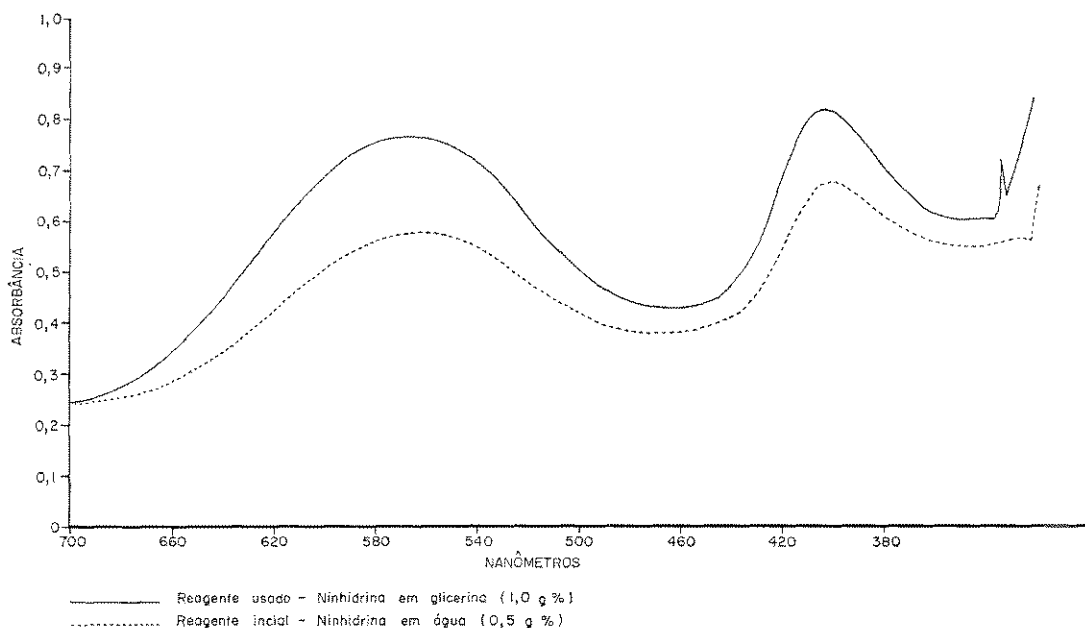


Fig. 2 — Espectro de absorção da neomicina

O método foi testado em medicamentos na forma líquida e de pomadas contendo, além do sulfato de neomicina, outras subs-

tâncias, tais como antibióticos, vasoconstritores e conservadores; os resultados encontram-se na tabela:

Análise quantitativa de sulfato de neomicina em medicamentos por espectrofotometria

Medicamentos	Forma farmacêutica	Quantidade teórica mg/ml ou g	Quantidade encontrada mg/ml ou g
A	pomada	25	24,8
B	"	30	29,0
C	"	25	24,8
D	"	50	48,0
E	líquido	1	0,95
F	"	1	1,15
G	"	0,1	0,98
H	"	1	1,05
I	"	0,1	0,101
J	"	0,5	0,47

Testes de recuperação do sulfato de neomicina foram feitos, usando-se, como suporte, medicamentos isentos de neomicina, a que se adicionaram 100 mg de sulfato de

neomicina por 100 ml. A média em 25 determinações foi 99%, sendo o resultado maior de 102% e o menor de 95%.

FREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Spectrophotometric determination of neomycin sulfate in pharmaceuticals by thin-layer chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 41-46, 1974.

SUMMARY: The contents of neomycin in a given pharmaceutical product can be promptly verified through the reaction of neomycin with ninhydrin in glycerinic medium and under certain pre-established conditions.

The method herein described is based on the reaction of neomycin with the ninhydrin reagent containing glycerin. Under such conditions the reaction becomes more perceptible and its results reproducible. Beer law applies to this case in a range between 4 to 40 μg neomycin sulfate per ml.

Some interfering agents were studied as well. In cases where the neomycin was to be separated prior to the reaction, a thin-layer chromatography method was used.

DESCRIPTORS: neomycin sulfate, determination in pharmaceuticals; thin-layer chromatography and spectrophotometry to determine neomycin.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOROWIECKA, B. — Colorimetric assay of neomycin in pharmaceuticals. *Dissnes pharm.* (Warsz.), 17 (3): 313-8, 1965 apud *Chem. Abstr.*, 65: 571f, 1966.
2. BRAMER, K.W. & HEMSON, L.J. — An electrophoretic method for the detection and estimation of microgramme quantities of neomycin in serum protein solutions. *J. Chromat.*, 19: 456-8, 1965.
3. BRODASKY, T.F. — Thin-layer chromatography of the mixed neomycin sulfates on carbon plates. *Analyt. Chem.*, 35: 343-5, 1963.
4. BURNS, D.T.; LLOYD, G.H. — Colorimetric determination of neomycin. *Lab. Pract.* (Eng.), 17 (4): 448-9, 1968 apud *Chem. Abstr.* 69: 5239u, 1968.
5. DESHMUKH, P.V.; MEHTA, S.I. & VAIDYA, MADHUBARB, G. — Separation of neomyces by paper and thin-layer chromatography. *Hindustan antibiot. Bull.*, 12: 2-3, 68-70, 1969 apud *Chem. Abstr.* 73: 69890q, 1970.
6. FOPPIANO, R. & BROWN, B.B. — Quantitative analysis of neomycin sulfate by thin-layer chromatography. *J. pharm. Sci.*, 54: 206-8, 1965.
7. HOODLESS, R.A. — The assay of neomycin — *Analyst* (Lond.), 91: 333-4, 1966.
8. LARBRE, M.S. & DORCHE, M.J. — Reactions for identifying neomycin. *Bull. Trav. Soc. Pharm.* (Lyon), 6 (2): 61-2, 1962 apud *Chem. Abstr.* 58: 6648g, 1963.
9. LIGHTBOWN, J.W. & ROSSI, P. — The identification and assay of mixtures of antibiotics by electrophoresis in agar gel. *Analyst*, 90: 89-98, 1965.
10. MAEHR, H. & SCHAFFNER, C.P. — Resolution of neomycin and catenulin antibiotic complexes by ion exchange resin chromatography. *Anal. Chem.*, 36: 104-8, 1964.
11. MAJUMDAR, M.K. & MAJUMDAR, S.K. — Separation and quantitations of neomyces as free base by paper chromatography. *Appl. Microbiol.*, 17: 763-4, 1969.
12. MARGOSIS, M. & TSUJI, K. — Optimum conditions for GLC analysis of neomycin. *J. pharm. Sci.*, 62: 1836-8, 1973.

PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Determinação espectrofotométrica do sulfato de neomicina em medicamentos, diretamente e após separação por cromatografia em camada delgada *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 41-46, 1974.

13. MORGAN, J.W.; HONIG, A.B.; WARREN, A.T. & LEVINE, S. — Spectrophotometric assay for neomycins B and C in pharmaceutical preparations. *J. pharm. Sci.*, **50**: 668-71, 1961.
14. STRETTON, R.J.; CARR, J.P. & WATSON-WALKER, J. — The separation of neomycin sulphate, polymyxin B sulphate and zinc bacitracin. *J. Chromat.*, **45**: 155-8, 1969.

Recebido para publicação em 17 de maio de 1974.

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ERITROMICINA EM MEDICAMENTOS *

Waldomiro PREGNOLATTO **
Neusa Santesso GARRIDO **

RIAL-A/399

PREGNOLATTO, W. & GARRIDO, N.S. — Determinação espectrofotométrica de eritromicina em medicamentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 47-51, 1974.

RESUMO: Neste trabalho foi descrito um método simples para a dosagem de eritromicina em medicamentos. O método envolve a determinação espectrofotométrica, a 540 nm, do composto formado quando da reação da eritromicina com xantidrol em meio ácido.

Estabeleceram-se as condições ideais para a reação e verificou-se a possibilidade de interferência de algumas substâncias que possam ser encontradas em mistura com eritromicina em medicamentos.

Testes de recuperação foram feitos. O erro do método é da ordem de 2%.

Também foram estabelecidas condições para separação e dosagem da eritromicina e seus sais, quando em mistura com tetraciclina e espiramicina, por cromatografia em camada delgada.

DESCRITORES: eritromicina em medicamentos, determinação espectrofotométrica; cromatografia em camada delgada, na determinação de eritromicina.

I N T R O D U Ç Ã O

A determinação da eritromicina em medicamentos constitui, ainda hoje, um problema, apesar de que a literatura já registra alguns métodos, tanto biológicos como químicos.

FORD *et alii*¹ preconizaram o uso de ácido sulfúrico 27 N como reagente para a determinação espectrofotométrica da eritromicina, enquanto que KORCHAGIN *et alii*² usaram como reagente ácido sulfúrico

18 N e leitura espectrofotométrica no visível, usando filtro azul.

Estes métodos são aplicáveis para eritromicina pura e não o são para preparados contendo antibióticos em misturas diversas.

PESEZ³ recomenda o uso de sulfato de metila na determinação de eritromicina usando como solvente etilmetilcetona. Este método apresenta os mesmos defeitos dos anteriores, com a desvantagem ainda de se ter que trabalhar com sulfato de metila.

* Realizado na Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A literatura registra ainda outros métodos para dosar eritromicina como o de WASHBURN⁸ (por espectrofotometria no infra-vermelho), só aplicável para a substância pura, pois para xaropes ou comprimidos este método é impraticável.

Os métodos de KUZEL *et alii*⁴ e TEPE *et alii*⁷ (hidrólise em meio alcalino e leitura em espectrofotômetro a 236 nm) também são aplicáveis para a substância pura.

KAKEMI *et alii*² (através de hidrólise alcalina, extração e reação com ácido bórico e metilorange e leitura espectrofotométrica em 508 nm), descrevem método trabalhoso envolvendo reação de hidrólise e extração, com resultados duvidosos.

OCHAB *et alii*⁵ recomendam um método para dosar eritromicina em presença de tetraciclina, que consiste em separá-las primeiramente por cromatografia em papel, usando como solvente a mistura clorofórmio — etanol — ácido acético anidro — água (100:10:10:1). A mancha correspondente à eritromicina é localizada pela imersão do papel em uma solução de ácido tricloroacético etanólico a 25%, contendo 0,4% de cloramina. A mancha é eluída com 5 ml de ácido acético glacial e a solução assim obtida é tratada com xantidrol (20 mg em 100 ml de ácido acético glacial ao qual se juntam 2 ml de ácido clorídrico concentrado. A reação se processa em banho-maria fervente por 3 minutos, segundo recomendação dos autores.

Procurou-se, neste trabalho, estabelecer um método rápido e prático para determinar eritromicina em medicamentos (xaropes, comprimidos e elixires), tendo como base a reação de Ochab *et alii* por nós modificada. Quantidades apropriadas do medicamento são dissolvidas em solução de ácido acético — etanol (1:1). Aliquotas dessa solução são tratadas com um reagente à base de xantidrol e o produto colorido resultante é dosado espectrofotometricamente a 540 nm. As leituras obtidas são comparadas em uma curva padrão pré-estabelecida.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Espectrofotômetro Coleman Junior II
Cubas de 16 mm de diâmetro
Cuba cromatográfica
Micropipetas
Placas de vidro de 20 x 20 cm

Reagentes

Xantidrol (9-xanthenol) a 0,15% p/v em ácido clorídrico — ácido acético (12:1)
Ácido acético — etanol (1:1)
Eritromicina
Ácido acético glacial
Ácido clorídrico
Sílica gel G
Acetato de amônio 15% (acertar até pH = 10,1 com hidróxido de amônio)

Solvente

Acetato de etila — isopropanol — acetato de amônio 15% — pH = 10,1 (9:7:8)

Técnicas

1. Determinação direta

Transfira para um balão volumétrico uma quantidade da amostra do produto a ser analisado de maneira que a solução final contenha de 50 a 200 µg de Eritromicina por ml e complete o volume com a solução de ácido acético-etanol (1:1). Homogeneize. Filtre, se necessário.

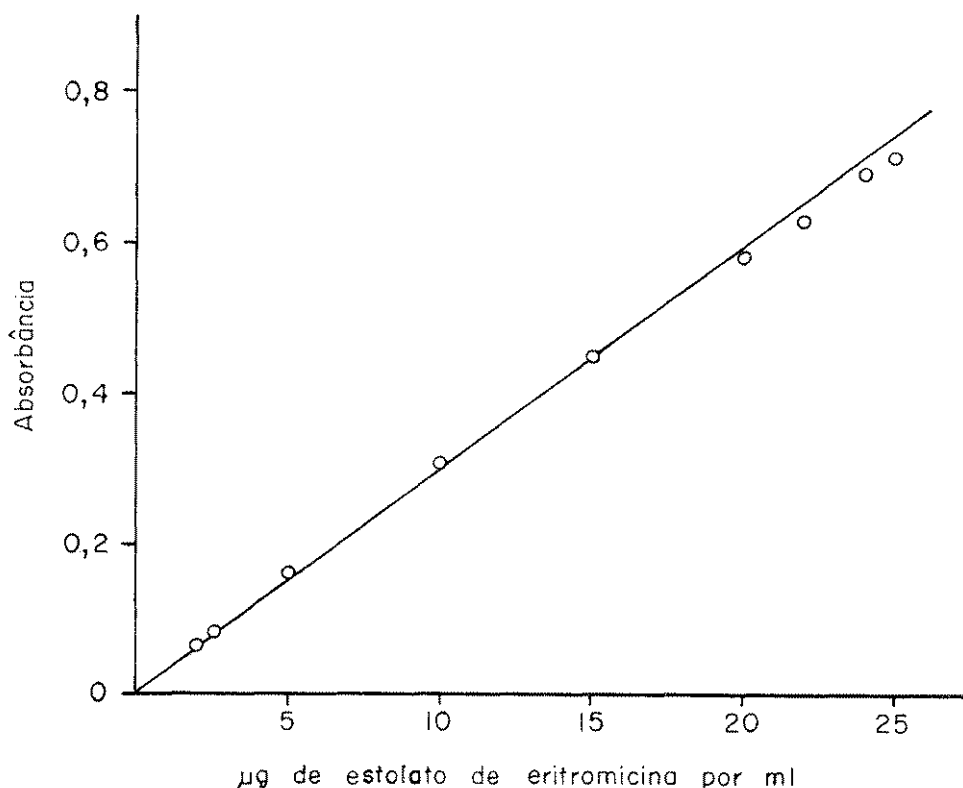
Em tubo de ensaio, pipete, pela ordem, 1 ml da solução amostra, 1 ml do reagente xantidrol e 8 ml de ácido acético glacial. Agite cuidadosamente.

Aqueça em banho-maria fervente durante, exatamente, um minuto e esfrie rapidamente em banho de gelo.

Transfira a solução para cuba de espectrofotômetro, espere 5 minutos, determine a absorbância a 540 nm, usando como branco o reagente + ácido acético (1:9).

Calcule, comparando a leitura em curva padrão pré-estabelecida (fig. pag. seguinte).

Observação: Os reagentes devem ser adicionados na ordem e os tempos indicados devem ser rigorosamente obedecidos.



Curva padrão para determinação espectrofotométrica de estolato de eritromicina. Espectrofotômetro Coleman Jr., 540 nm, cuba de 16 mm.

2. *Determinação em presença de substâncias interferentes (tetraciclina e/ou espiramicina)*

No caso em que a eritromicina esteja associada a tetraciclina ou espiramicina ou outras substâncias que possam interferir, torna-se necessário separá-las inicialmente, o que se consegue por cromatografia em camada delgada.

Transfira para placas de Sílica gel G de 20 x 20 cm e 0,25 mm de espessura, dividida de 3 em 3 cm, previamente ativada a 105°C por 30 minutos, alíquotas de uma solução que contenha de 25 a 50 µg de eritromicina em mistura com tetraciclina, espiramicina ou outros interferentes.

Desenvolva o cromatograma usando como solvente a solução de acetato de etila — isopropanol — acetato de amônio 15% — pH = 10,1 (9:7:8). Seque ao ar. Revele com a solução de xantidrol a 0,15%, aquecendo em estufa a 105°C, durante 2 minutos. A mancha a um Rf de 0,81 corresponde ao estolato de eritromicina, a de Rf 0,22 a tetraciclina e a de Rf 0,68 a espiramicina.

Retire o material da placa no Rf 0,81, elua em 10 ml de ácido acético — etanol (1:1), determine a absorbância no espectrofotômetro a 540 nm.

Calcule, comparando a leitura em curva padrão pré-estabelecida nas mesmas condições.

*Teor de eritromicina em diversos medicamentos **

Forma medicamentosa	Amostras analisadas	Teor declarado mg/unidade	Teor encontrado (variação) máximo-mínimo mg/unidade
Comprimidos simples	6	125	130-115
Comprimidos simples	6	250	258-242
Suspensão	20	180	182-172
Comprimidos em mistura com tetraciclina	12	125	127-118

* Os produtos analisados são de três diferentes laboratórios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método apresentado é simples, reproduzível, realizável em qualquer laboratório modesto e pode ser usado na determinação da eritromicina diretamente na grande maioria das especialidades farmacêuticas que a contenham (comprimidos, xaropes) seja na forma básica ou de seus sais, como o estolato, por exemplo.

A lei de Beer é obedecida entre concentrações de 2,5 a 15,00 μg de eritromicina por ml nas condições estabelecidas.

Para se estabelecerem as melhores condições da reação em função do tempo e da temperatura, experimentos foram feitos, resultando que a reação se completa em banho-maria fervente em um minuto, sendo este o tempo máximo ideal de aquecimento. Tempos maiores de aquecimento levam à decomposição do composto colorido formado, com valores menores de absorção e não reproduzíveis.

O reagente xantidrol deve ser guardado em geladeira e usado após cinco dias de preparado.

Com esta técnica, determinamos o teor de eritromicina em diversos medicamentos. Os resultados obtidos nestes testes são dados na tabela acima.

Em provas de recuperação por nós feitas, sempre encontramos o teor de eritromicina adicionado. O erro do método é de 2,0%.

Verificou-se a interferência de várias substâncias (penicilina, neomicina, cloranfenicol, bacitracina, tetraciclina, polimixina B, espiramicina, estreptomina). Destas, somente a tetraciclina e espiramicina interferem, sendo que a espiramicina, de maneira muito mais evidente.

Método para separação cromatográfica e dosagem da eritromicina em presença de substâncias interferentes, como a tetraciclina e a espiramicina, também está descrito.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Laboratil S. A. — Indústria Farmacêutica, pelo fornecimento de eritromicina e estolato de eritromicina padronizados.

RIAL-A/399

PREGNOLATTO, W. & GARRIDO, N.S. — Spectrophotometric determination of erythromycin in pharmaceuticals. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 47-51, 1974.

SUMMARY: A simple method to determine the dosage of erythromycin in pharmaceuticals is herein described.

The method comprises the spectrophotometric detection at 540 nm of the compound resulting from a reaction between erythromycin and xanthydrol, in an acid medium.

The ideal condition for the reaction to take place were established and the possibility of interference by some chemical element that might be found in mixture with the erythromycin contained in such pharmaceuticals were investigated.

Recovery tests were made. Error rate method is around 2%.

The necessary conditions for thin-layer chromatography separation and determination of erythromycin and its salts when mixed with tetracycline and spiramycin were also established.

DESCRIPTORS: erythromycin in pharmaceuticals, spectrophotometric determination; thin-layer chromatography to determine erythromycin.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FORD, J.H.; PRESCOTT, G.C. HINMAN, J.W. & CARON, E.L. — Colorimetric determination of erythromycin. *Analyt. Chem.*, **25** (8): 1195-7, 1953.
2. KAKEMI, K.; UNO, T. & YAMASHINA, H. — Chemical methods for the determination of antibiotics. VI. Colorimetric determination of erythromycin. *J. Pharm. Soc. Japan*, **76** (10): 1116-8, 1956 apud *Analyt. Abstr.*, **4**: 3104, 1957.
3. KORCHAGIN, V.B.; SEMENOV, S.M. & SAVUSHKINA, L.N. — Colorimetric determination of erythromycin. *Antibiotiki*, **6** (4): 311-4, 1961 apud *Analyt. Abstr.* **8**: 4818, 1961.
4. KUZEL, N.R.; WOODSIDE, J.M.; COMER, J.P. & KENNEDY, E.E. — Spectrophotometric determination of erythromycin in pharmaceutical products. *Antibiot. & Chemother.*, **4** (12): 1234-41, 1954 apud *Analyt. Abstr.*, **2**: 1308, 1955.
5. OCHAB, S.; MALYZS, D. & BOROWIECKA, B. — Determination of erythromycin in the presence of tetracycline in pharmaceuticals. *Chem. Anal., Warsaw*, **8** (4): 597-600, 1963 apud *Analyt. Abstr.*, **11**: 3926, 1964.
6. PESEZ, M. — Colorimetric determination of erythromycin by means of methylsulphate. *Ann. Pharm. Franç.*, **13** (7-8): 513-6, 1955 apud *Analyt. Abstr.*, **3**: 1857, 1955.
7. TEPE, J.B. & ST. JOHN, C.V. — Determination of erythromycin by ultraviolet spectrophotometry. *Analyt. Chem.*, **27** (5): 744-6, 1955.
8. WASHBURN, W.H. — The infra-red determination of erythromycin. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.* **43** (1): 48-9, 1954 apud *Analyt. Abstr.*, **1**: 1632, 1954.

Recebido para publicação em 31 de maio de 1974.

CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE AMOS-
TRAS DE *SALMONELLA TYPHI* ISOLADAS EM UM SURTO EPIDÊ-
MICO DE FEBRE TIFÓIDE OCORRIDO NO MUNICÍPIO
DE SÃO PAULO, BRASIL *

Ernesto HOFER **
Gil Vital Alvares PESSÓA ***
José de Souza de MORAIS ****
Carmo Elias de Andrade MELLES ***
Estevão José COLNAGO **
Maria Diana LACERDA *****
Maria Ignez VILHENA ****

RIAL-A/400

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COL-
NAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações
sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* iso-
ladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município
de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 53-67, 1974.

RESUMO: Em um surto epidêmico de febre tifóide, ocorrido no perí-
do de fevereiro a maio de 1972, no Estado de São Paulo, foram isoladas
187 amostras de *Salmonella typhi*.

Estas culturas foram analisadas sob vários aspectos, tais como:
sorológico, no qual foram classificadas segundo a variação do antígeno
Vi; bioquímico, em que se fez a determinação dos tipos fermentativos,
com base nas reações diante da xilose e arabinose, aliado à pesquisa
da tetrationato redutase; a avaliação da sensibilidade aos antibióticos
foi outra particularidade abordada e, finalmente, as amostras foram
caracterizadas por um processo dos mais sensíveis, representado pela
lisotipia ou fagotipagem Vi.

Os resultados encontrados demonstraram uma situação pouco co-
mum nos dias atuais, isto é, o reconhecimento em uma epidemia de fe-
bre tifóide de três tipos fágicos, respectivamente D_6 , E1a e A, além de
duas formas consideradas impróprias para as determinações com os
fagos adaptados Vi II (amostras com Vi degradadas e as desprovidas
desta fração antigênica).

DESCRITORES: *Salmonella typhi*; febre tifóide (São Paulo); bac-
teriófagos.

* Trabalho em cooperação do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Os-
waldo Cruz, Rio de Janeiro, GB, da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São
Paulo, S.P. e do Serviço de Epidemiologia e Estatística do Departamento Regional de Saúde
da Grande São Paulo, São Paulo, S.P.

** Do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Insti-
tuto Oswaldo Cruz.

*** Da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

**** Do Serviço de Epidemiologia e Estatística do Departamento Regional de Saúde da Grande
São Paulo.

***** Do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto Presidente Castelo Branco, Rio de
Janeiro, GB, e do Instituto Oswaldo Cruz.

INTRODUÇÃO

A febre tifóide, no transcurso das últimas décadas, vem exibindo um acentuado declínio em sua freqüência na maioria dos países, principalmente naqueles que galgaram e se beneficiaram na condição de nações de elevado padrão sócio-econômico. Já não são comumente relatados, na literatura médica, os tão amiúde surtos de natureza epidêmica, que envolviam e criavam tantos dissabores às populações dos grandes centros urbanos, como no princípio do presente século.

Conquanto tenham esses países atingido o mais alto aprimoramento no campo sanitário, particularmente pelas rígidas normas profiláticas adotadas, mesmo assim essas medidas não redundaram na erradicação absoluta da doença, pois, periodicamente, são registrados surtos de maior ou menor repercussão. Tal situação epidemiológica encontra um amparo inequívoco nos acontecimentos mais recentes, relatados pelos episódios ocorridos na Suíça⁷ e em Aberdeen, na Grã-Bretanha⁸.

Em outras regiões no mundo, ainda não plenamente beneficiadas em seu desenvolvimento, a febre tifóide persiste e exterioriza-se, sob o ponto de vista epidemiológico, como uma das principais endemias que, com relativa freqüência, assumem as características de verdadeiras epidemias, naturalmente na dependência direta da estrutura da comunidade do local.

Dentre as inúmeras condições propuloras deste estado, responsabilizam-se as deficiências contidas nos elementos básicos de saneamento ofertados às cidades e aos seus moradores. Sem dúvida alguma, esta insuficiência teve origem em parte do problema criado pelo crescimento vertiginoso da população nessas áreas, advindo de descontrolados fluxos migratórios internos.

É natural pois que, por tais vicissitudes, a ocorrência de febre tifóide ou de outras êntero-infecções seja relativamente comum em nosso meio, muito embora não tenha sido acompanhada com número idêntico de investigações ou referências, que tivessem retratado os vários aspectos atinentes ao seu aparecimento e disseminação.

Convém frisar, sob esse prisma, que a grande maioria das informações nacionais concentrou suas atenções quase que exclusivamente em análises epidemiológicas circunstanciais, obtendo, por conseguinte, resultados meramente subjetivos, não revelando esses trabalhos, em nenhuma ou apenas em raras ocasiões, discretos subsídios sobre ensaios laboratoriais efetuados.

A exigüidade de dados sobre esse tema em pauta em nosso meio e a particularidade digna de ponderação, representada por cerca de duas centenas de culturas de *Salmonella typhi* isoladas de um surto epidêmico ocorrido em 1972, em uma localidade do município de S. Paulo (Parque Edú Chaves), influenciaram-nos, sobretudo, neste estudo laboratorial.

A análise das amostras dos bacilos típicos concentrou-se na execução de várias provas dentro do aspecto bacteriológico, citando-se as seguintes: a caracterização fágica Vi ou lisotípi Vi; a classificação dos tipos fermentativos; a pesquisa da tetratio-nato redutase; a avaliação da sensibilidade aos antibióticos e finalmente a determinação do grau de integridade do antígeno Vi, de acordo com a variação V-W de KAUF-FMANN¹⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 187 culturas de *Salmonella typhi*, isoladas e identificaadas preliminarmente na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. Desse total, 153 resultaram de hemoculturas e 34 provieram de coproculturas.

Cumprе salientar que as amostras foram isoladas em dois períodos distintos: a primeira etapa, entre fevereiro a 28 de março de 1972, compreendeu 129 amostras obtidas de hemoculturas, e 17, de coproculturas; a segunda fase esteve representada pelos isolamentos efetuados no mês de abril até 18 de maio de 1972, registrando-se 24 amostras oriundas de hemoculturas e 17, de coprocultivos.

Todas as amostras foram recebidas em tubos contendo ágar nutriente, sendo de imediato analisadas do ponto de vista soro-

lógico, nas quais se procurou caracterizar seus componentes e sua integridade antigênica, no que concerne, especificamente, à variação V-W de Kauffmann. Esta determinação foi realizada através do emprego da técnica de aglutinação rápida com os soros somáticos "9 e Vi".

Em etapa subsequente, foram procedidos o reconhecimento e o isolamento de colônias dos bacilos típicos com riqueza de antígeno Vi, geralmente representados pelas colônias mais opacas quando crescidas em ágar nutriente, de acordo com a descrição de CRAIGIE & BRANDON¹⁰. Além desse critério de seleção, utilizou-se também, para tal finalidade, o processo relatado por NICOLLE et alii²⁶ e LANDY²². Em média, quando presentes nas placas de ágar nutriente, recolhiam-se 10 colônias características da fase V, de cada uma das culturas examinadas.

É necessário salientar que toda a plenitude das reações da lisotipia Vi de *Salmonella typhi* depende essencialmente do manuseio de culturas que tenham demonstrado riqueza e integridade do antígeno Vi.

Para a execução da lisotipia Vi, recorreu-se à técnica relatada primariamente por CRAIGIE & YEN¹², considerando as modificações introduzidas por CRAIGIE & FELIX¹¹, assim como as de ANDERSON & WILLIAMS⁴. Todas as preparações fágicas, utilizadas na presente investigação, originaram-se do "International Reference Laboratory for Enteric Phage Typing", Londres, Inglaterra, gentilmente fornecidas pelo Dr. A. S. Anderson.

Foram utilizadas 60 preparações adaptadas do bacteriófago Vi II, além dos fagos Vi não adaptados I, IV e VII, sendo os dois primeiros associados e o último, sob a forma isolada, constituindo-se no elemento discriminador da lisotipia complementar do lisotipo El, segundo BRANDIS⁹. Lançou-se mão ainda, no esquema da tipificação, dos fagos somáticos (01, 02 e 03) de FELIX & CALLOW¹³.

A atividade fermentativa das amostras em presença da arabinose e da xilose, de acordo com o critério de classificação apresentado por KRISTENSEN & HENRIK-

SEN²¹ e KRISTENSEN²⁰, foi evidenciada segundo processo já anteriormente relatado por HOFER¹⁵.

Para a determinação da tetracionato reductase, recorreu-se ao método recentemente descrito por LE MINOR et alii²³.

Finalmente, quanto à avaliação do grau de sensibilidade das amostras em face aos antibióticos, esta foi ensaiada empregando-se o processo de difusão pelo sistema de discos impregnados*.

Em relação aos aspectos atinentes ao inóculo, ao tempo de incubação e ao processo de leitura dos antibiogramas, foram adotadas, em linhas gerais, as recomendações apresentadas no método de BAUER et alii⁶.

RESULTADOS

O primeiro aspecto, imediatamente arrolado nas amostras de *Salmonella typhi*, refere-se ao problema das caracterizações sorológicas, tendo como modelo a variação V-W de Kauffmann. Com o estudo dessa variação, visa-se definir as culturas segundo a presença (total ou parcial) ou ausência de antígeno Vi, obtendo-se, no presente ensaio, os seguintes resultados que estão assinalados na tabela 1:

TABELA 1

Frequência das formas da variação V-W encontradas nas amostras

Forma	N.º	%
V	14	7,48
V-W	165	88,24
W	8	4,27
Total	187	99,99

Observa-se, portanto, que praticamente 90% das culturas assinaladas apresentaram-se numa forma com evidente início da de-

* Multodiscs Oxoid, tipo Standard, Código n.º 2033E e polidiscos Victor Lorian.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 53-67, 1974.

gradação do antígeno Vi. Contudo, utilizando o recurso do plantio dessas amostras em placas contendo ágar nutriente, ainda foi possível, em sua quase totalidade, detectar e isolar colônias cujos constituintes mantiveram a integridade desejada de seu antígeno Vi.

Em relação aos resultados encontrados na lisotipia Vi, cumpre salientar que as determinações perpetradas e apresentadas na tabela 2 revelaram a presença de três tipos fágicos Vi, fenômeno que excepcionalmente ocorre em surtos de natureza epidêmica (fig. 1, 2 e 3).

TABELA 2

Frequência dos lisotipos de S. typhi, segundo as fontes de isolamento

Lisotipos e Formas	Origem				Total	
	Hemoculturas		Coproculturas			
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
D ₆	79	42,18	18	9,61	97	51,79
Vi degradadas	39	20,82	10	5,34	49	26,16
E l a	18	9,61	5	2,67	23	12,28
A	9	4,80	1	0,53	10	5,33
Vi negativas	8	4,27	—	—	8	4,27
Total	153	81,68	34	18,15	187	99,80

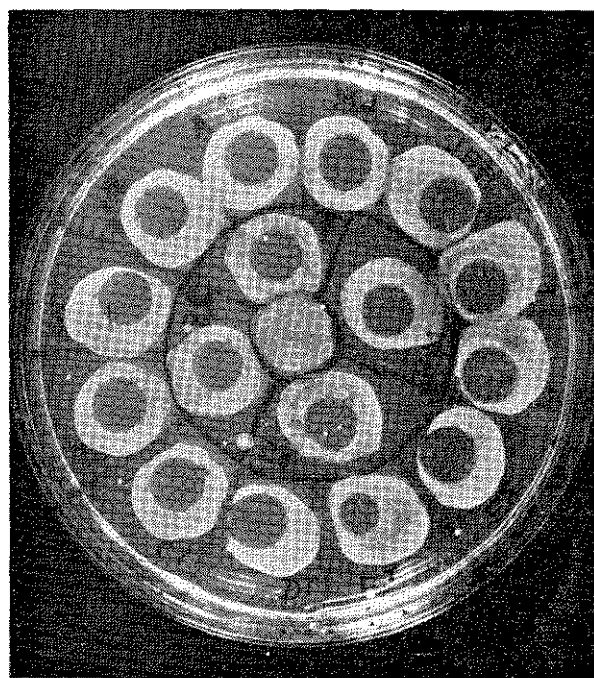


Fig. 1 — Lisotipo A.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 53-67, 1974.

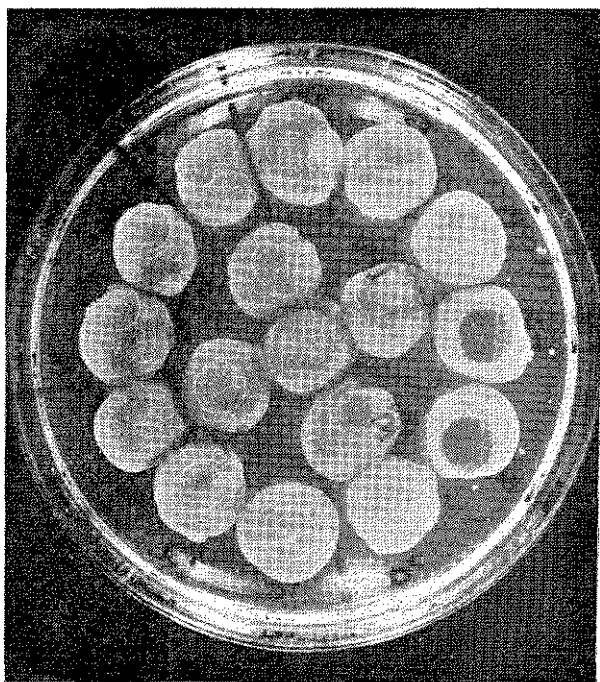


Fig. 2 — Lisotipo E₁.

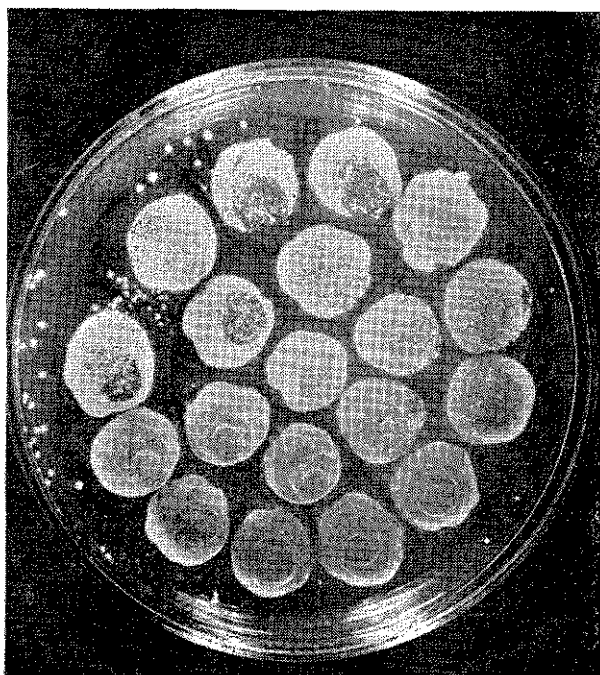


Fig. 3 — Amostra Vi degradada.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 53-67, 1974.

TABELA 3

Distribuição numérica dos lisotipos e formas, de acordo com os períodos de isolamento

Lisotipos e Formas	Hemoculturas		Coproculturas	
	até 28/3	até 18/5	até 28/3	até 18/5
D ₆	68	11	9	9
Vi degradadas	37	2	5	5
E 1 a	8	10	2	3
A	8	1	1	—
Vi negativas	8	—	—	—
Total	129	24	17	17

Ainda, no que tange à freqüência dos lisotipos e considerando os dois períodos nos quais se efetivaram os isolamentos das amostras, verificar-se-á que alguns detalhes podem ser discutidos nesse âmbito, baseados nas informações que constam da tabela 3.

Assim, nota-se que, na fase compreendida até 28/3/72, as amostras isoladas a partir de hemoculturas identificaram-se, proeminentemente, no lisotipo D₆, enquanto que, em plano bem inferior, localizaram-se os lisotipos E 1 a e A. Já no período limitado pela data de 18/5/72, compartilharam de uma posição destacada, praticamente em igualdade de condições, as amostras de *Salmonella typhi* pertencentes aos lisotipos D₆ e E 1 a. No tocante ao tipo fágico A, observa-se que, nesta fase, esteve figurado em uma única ocasião.

Outras diferenças podem ser discutidas, quando se confrontam os resultados das duas fases consideradas (tabela 3), situando-se, em particular, no aspecto das freqüências das amostras Vi degradadas e Vi negativas, isoladas a partir de hemoculturas.

Por outro lado, analisando os dados consignados para as amostras oriundas de coproculturas, verifica-se uma quase homogeneidade da freqüência dos tipos envolvidos nos dois períodos, ressaltando-se, sem maiores comentários, as discretas diferenças encontradas entre os lisotipos E 1 a e A.

Quanto ao comportamento bioquímico, sedimentado no sistema classificatório de Kristensen, obtiveram-se os resultados discriminados na tabela 4. Convém salientar que, para uma melhor apreciação de cunho epidemiológico, esses dados da atividade fermentadora foram associados àqueles encontrados na lisotípi.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 53-67, 1974.

TABELA 4

Distribuição dos tipos fermentativos segundo seus lisotipos

Lisotipos e Formas	Tipos fermentativos			
	Tipo I xilose positiva arabinose negativa		Tipo II xilose negativa arabinose negativa	
	N.º	%	N.º	%
D ₆	—	—	97	51,79
Vi degradadas	1	0,53	48	25,63
E l a	23	12,28	—	—
A	10	5,34	—	—
Vi negativas	2	1,06	6	3,21
Total	36	19,21	151	80,63

Quanto aos tipos bioquímicos dos lisotipos de *Salmonella typhi*, nota-se que entre as amostras de bacilos típicos estudadas predominou o tipo fermentativo II (sem ação sobre a arabinose e a xilose), influenciado extraordinariamente pela localização, nesse biotipo, das culturas pertencentes ao lisotipo D₆ e Vi degradadas, que representaram acima de 75% das amostras examinadas.

No que concerne à pesquisa da tetratio-nato redutase, adotando o mesmo critério de conjugar esses resultados aos da lisotipia, observa-se uma destacada ocorrência das amostras possuidoras da tetratio-nato redu-tase, excetuando-se as culturas do lisotipo A, que se mostram incapazes de desdobrar o tetratio-nato (tabela 5):

TABELA 5

Frequência da tetratio-nato redutase entre as amostras estudadas

Lisotipos e Formas	Tetratio-nato redutase			
	positiva		negativa	
	N.º	%	N.º	%
D ₆	97	51,79	—	—
Vi degradadas	49	26,16	—	—
E l a	23	12,28	—	—
A	—	—	10	5,34
Vi negativas	8	4,27	—	—
TOTAL	177	94,50	10	5,34

Finalmente, em relação à análise dos resultados do comportamento das amostras diante dos antibióticos e quimioterápicos, tem-se a assinalar, como detalhe de maior importância, a ausência de amostras que tivessem demonstrado qualquer sinal de resistência às concentrações de cloranfenicol, ampicilina, kanamicina, hetacilina, cefalotina, gentamicina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico e colimicina, contidos nos discos. Salienta-se, no entanto, que 5 e 12 amostras, respectivamente, evidenciaram resistência à estreptomomicina e à tetraciclina. Aquelas culturas, rotuladas como estreptomomicina resistentes, caracterizaram-se em quatro oportunidades como lisotipo D₆ e, em uma, como Vi degradada.

No que tange às amostras resistentes à tetraciclina, anotaram-se oito como Vi degradadas, duas do lisotipo E 1 a, reconhecendo-se, em uma única ocasião, os lisotipos A e D₆.

DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a ocorrência de casos de febre tifóide no Estado de São Paulo vem, de longa data, positivando-se de maneira incontestável, principalmente após as memoráveis pesquisas de LUTZ^{24,25}. Em suas observações, que remontam ao fim do século passado, demonstrou esse notável pesquisador, nos vários ângulos abordados, como o anatomopatológico, o bacteriológico e mesmo através do recurso sorológico incipiente na época, a existência da doença e o isolamento do agente etiológico, em indivíduos acometidos das então chamadas "febres paulistas".

Com o correr dos anos até os dias atuais, inúmeros foram os surtos epidêmicos registrados na capital ou em outros diferentes pontos do Estado de São Paulo, como pode ser atestado pelos minuciosos levantamentos realizados sobre este assunto, por GALVÃO *et alii*¹⁴ e SCHMID³⁰. Observa-se, no entanto, com base nessas análises retrospectivas, que historiaram a casuística da maioria dos grandes surtos de febre tifóide em nosso meio, que raríssimas são as oportunidades nas quais esses episódios, tanto aqueles ocorridos em São Paulo, como em

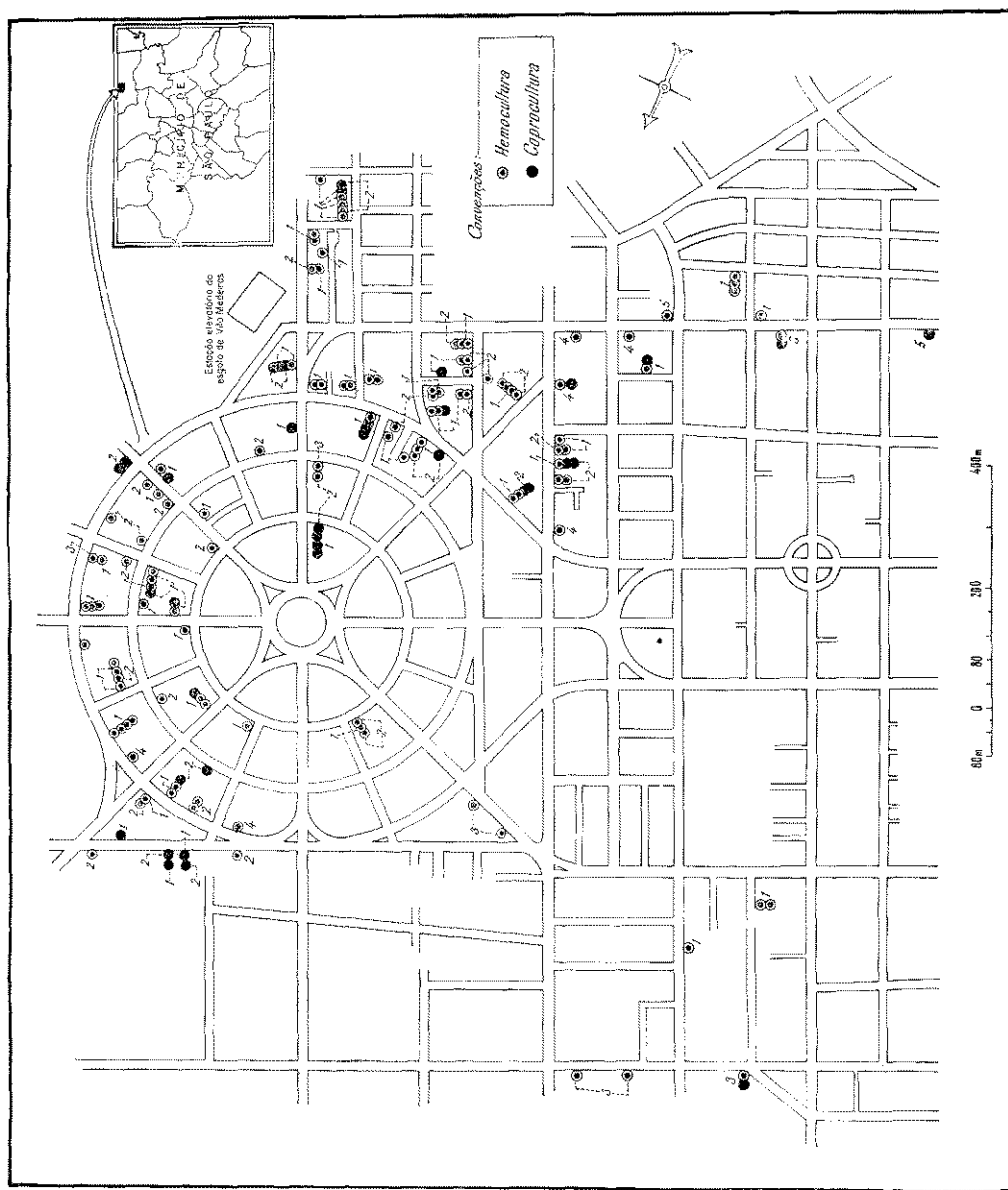
qualquer outra região do Brasil, tenham também sido investigados detidamente sob o prisma bacteriológico, excetuando-se talvez, dessa condição, o trabalho de PACHECO²⁸. Na realidade, os ensaios de laboratório, ligados ao problema da febre tifóide, não se limitam apenas ao simples isolamento do agente etiológico mas, muito ao contrário, propiciam hodiernamente elementos de extraordinário valor para o esclarecimento da implantação e da propagação do bacilo tífico em uma determinada área pesquisada, fundamentais para um estudo epidemiológico mais aprofundado.

Assim, condicionados sob essa premissa, foram efetivados alguns estudos de caráter tipicamente bacteriológico nas amostras de *Salmonella typhi*, oriundas de um surto epidêmico de febre tifóide irrompido no fim de fevereiro de 1972, que se prolongou no ano citado. A enfermidade atingiu membros constituintes da população do Parque Edú Chaves, Jardim Brasil e Vila Sabrina, bairros vizinhos e localizados na periferia do município de São Paulo.

Cumprе salientar que o maior número das amostras analisadas originou-se dos casos ocorridos no Parque Edú Chaves, como pode ser atestado pela sua distribuição geográfica, esquematizada no mapa (fig. 4). São também assinalados, no referido mapa, outros pormenores como as fontes das quais foram isoladas as amostras (hemoculturas e coproculturas) e os lisotipos e formas reconhecidas.

As localidades envolvidas no surto de febre tifóide pertencem ao subdistrito de Tucuruvi, que se acha situado ao norte do município, tendo como detalhe topográfico de maior importância a presença do rio Caçu, afluente da margem direita do rio Tietê. Segundo uma estimativa extra-oficial, a população da área, na qual ocorreu a epidemia, foi calculada aproximadamente em 100.000 habitantes.

Baseados nos cálculos apresentados por GALVÃO *et alii*¹⁴ referentes aos coeficientes médios de morbidade por febre tifóide no município de São Paulo, durante o período 1949-1953, conclui-se que o subdistrito de Tucuruvi, assim como as áreas limítrofes, representadas por Santana e Vila



- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Lisotipo D ₆ | 4. Lisotipo A |
| 2. Formas Vi degradadas | 5. Amostras Vi negativas |
| 3. Lisotipo E 1 a | |

Fig. 4 — Distribuição geográfica dos lisotipos caracterizados, na epidemia de febre tifóide no Parque Edú Chaves, município de São Paulo.

Maria, já ocupavam, naquela época, posições das mais proeminentes na ocorrência desta enfermidade.

Os resultados deparados nas caracterizações bacteriológica e bioquímica das amostras evidenciaram nitidamente um fenômeno de rara ocorrência nos dias atuais, pois demonstraram a presença concomitante de três tipos fágicos (A, E1a e D₆), além de duas formas de *Salmonella typhi* (amostras Vi degradadas e Vi negativas), representados por dois tipos distintos de natureza bioquímica, tanto na classificação de Kristensen, como na pesquisa da tetraonato redutase.

A existência de mais de um lisotipo Vi, em uma epidemia de febre tifóide, contraria frontalmente a teoria da origem unitária desse acontecimento, exceção feita, quando o mecanismo de transmissão for efetivado através de um veículo contaminado por águas de esgoto, provenientes principalmente de um grande centro populacional, fonte por demais reconhecida como albergadora de mais de um tipo fágico de *Salmonella typhi*.

A irrupção de um pequeno número de casos da doença, limitada a uma área, permite ainda supor, não para essa eventualidade analisada, a presença de um portador na cadeia epidemiológica, que se caracteriza por eliminar, para o meio ambiente, dois tipos fágicos aparentados de *Salmonella typhi*, sendo que um, provavelmente,

propiciou a derivação do outro tipo, no próprio organismo do portador. Este fenômeno foi, inicialmente, estudado e comprovado "in vitro" por ANDERSON ¹, que em outro minucioso trabalho, de publicação mais recente ², investigou e corroborou a transformação ocorrida no lisotipo 34 para o tipo A, quando a amostra do fagotipo precursor, isto é, tipo 34 foi introduzida artificialmente em carnes enlatadas. Este acontecimento veio a se constituir no elemento fundamental para explicar o fenômeno da presença de dois lisotipos na epidemia de Aberdeen, cujo veículo, de disseminação, esteve representado por tal alimento.

Um detalhe extremamente interessante situa-se nos resultados da lisotipia das amostras do Parque Edu Chaves, que propiciaram a caracterização do tipo fágico D₆. Pode-se, inclusive, afirmar que se tratou de um achado surpreendente, com base sedimentada nas investigações anteriores ^{16, 17} que, em nenhuma oportunidade até então, tinham possibilitado detectar o lisotipo D₆ entre as culturas de bacilos típicos oriundas dos Estados de São Paulo e da Guanabara.

Para uma comprovação e, por conseguinte, uma melhor avaliação dessa particularidade assinalada, são apresentados, na tabela 6, os dados referentes à frequência dos diferentes lisotipos ocorrentes na região que foi acometida com os casos de febre tifóide, assim como, em áreas vizinhas, durante o período de 1966-1970.

TABELA 6

Lisotipos de S. typhi encontrados no Parque Edu Chaves, Jardim Brasil e áreas vizinhas no período de 1966-1970.

Localidades	Lisotipos					Vi Degradadas	Total
	A	E 1 a	F 1	L 1	I + IV		
Jardim Brasil	1	2	—	2	1	—	6
Tucuruvi	3	1	1	—	—	—	5
Guarulhos	3	—	—	—	1	—	4
Jaçanã	1	—	—	—	1	1	3
Edu Chaves	1	1	—	—	—	—	2
Vila Medeiros	—	—	—	—	1	—	1
Total	9	4	1	2	4	1	21

Em complemento à análise da lisotipia, acrescenta-se que os resultados da caracterização bioquímica dessas amostras revelaram, em sua totalidade, que aquelas pertencentes aos tipos fágicos A, L₁ e I+IV classificaram-se no biotipo II, enquanto que os lisotipos E 1 a e F1 enquadraram-se no biotipo I. Sem uma única exceção, todas as culturas evidenciaram a presença da tetracionato redutase.

Convém todavia frisar que entre as amostras provenientes de Salvador, Bahia (dados a serem publicados), foram caracterizadas algumas como pertencentes ao lisotipo em questão, deixando portanto bem claro que, em certas áreas do Brasil, este tipo fágico está presente. Ainda, em relação a esse pormenor, destaca-se que o perfil bioquímico das amostras do lisotipo D₆, tanto daquelas isoladas em São Paulo como as da Bahia, foi idêntico, situando-se no biotipo II, da classificação de Kristensen (xilose e arabinose negativas) e demonstrando, na totalidade, serem possuidoras da tetracionato redutase.

Outro fato, digno de uma exposição pormenorizada, reside no ponto figurado pelo grande número de exemplares de amostras consideradas impróprias para a lisotipia, representadas pelas culturas com o antígeno Vi degradado. Pela possibilidade da caracterização por meio das preparações adaptadas do fago Vi II, essas amostras criam extraordinária dificuldade, ou mesmo, tornam-se inadequadas a qualquer outra iniciativa nesse campo, para a identificação de seus lisotipos primitivos. No problema em pauta, as nossas amostras, definidas como Vi degradadas, podem ser admitidas como prováveis descendentes do lisotipo D₆, em decorrência de apresentarem uma nítida resistência à lise por ação dos fagos somáticos (01, 02 e 03) de Felix e Callow, comportando-se, de modo idêntico, àquelas culturas, reconhecidas no tipo fágico D₆. Além disso, salienta-se que os demais lisotipos envolvidos na epidemia, E 1 a e A, demonstraram ser sensíveis à ação lítica dos fagos somáticos.

Aumentando ainda mais esta possibilidade de um vínculo mais íntimo entre os lisotipos D₆ e as formas Vi degradadas, tem-se a assinalar o detalhe da homogenia das

reações observadas na tipificação bioquímica.

Finalmente, como em circunstância de difícil refutação do elo entre as duas formas de *Salmonella typhi*, pode-se alegar o isolamento do bacilo tífico nas duas vias pesquisadas, isto é, do sangue e das fezes dos mesmos doentes. Assim, em cinco indivíduos acometidos de febre tifóide, as hemoculturas efetuadas evidenciaram quatro vezes o lisotipo D₆ e em apenas uma ocasião, a forma Vi degradada. Já as coproculturas realizadas nessas mesmas pessoas revelaram, somente em duas oportunidades, o lisotipo D₆, ficando as três amostras restantes caracterizadas como Vi degradadas. Corroborando esta relação aventada, salienta-se que essas culturas apresentaram idênticas reações nas provas bioquímicas perpretadas, como também, foram observados resultados praticamente análogos nos antibiogramas.

Por sinal, este aspecto da transformação "in vivo" do lisotipo D₆ para formas Vi degradadas pode ser arrolado como uma tentativa para explicar o fenômeno da extrema labilidade do antígeno Vi, demonstrado por essas culturas. Desde o início, a grande maioria das amostras se comportaram dentro do esquema sorológico da variação V-W de Kauffmann, como espécimes cujo antígeno Vi estava em franca fase de degradação.

Aliás, à vista do problema exposto, existiria, além dos fatores normais que intrinsecamente influenciam as alterações que ocorrem nas estruturas antigênicas da *Salmonella typhi*, outro fator relacionado com o isolamento de umas poucas colônias ou, como na maioria das vezes ocorre, de uma única, durante a fase de identificação e sua posterior manutenção no laboratório. Desta forma, na eventualidade do recolhimento de uma colônia que por ventura estivesse na fase inicial de perda da especificidade do antígeno Vi, esta condição em sementeiras posteriores implicaria e revelaria o domínio de uma progênie com permanente deficiência ou total desaparecimento do antígeno Vi.

A fim de contornar tal problema, Anderson e Felix enfatizam como ponto capital para a observação plena das reações na lisotipia Vi que, de cada exame, sejam isoladas pelo menos dez colônias de *Salmo-*

nella typhi, na fase V, como também frisam a necessidade de que essas amostras devem ser mantidas preferencialmente em meio de Dorset ou Pai.

Contrastando a esta alteração verificada entre as amostras do lisotipo D₆ e os demais tipos fágicos envolvidos, principalmente, as culturas do lisotipo A evidenciaram um elevado grau de estabilidade do antígeno Vi, refletindo-se pela predominância de amostras na fase V, mesmo após terem sido efetuados alguns repiques, com a finalidade precípua de visualizar a intensidade da possível degradação deste antígeno de envoltório. Se antes não tinha sido detectado na região o lisotipo D₆, o mesmo fato não ocorreu com os dois outros tipos fágicos identificados, em particular o lisotipo E 1 a, cuja frequência foi das mais destacadas, em observações anteriores, apresentando também uma perfeita identidade no que concerne às reações bioquímicas. Assim, agruparam-se essas amostras no biotipo I, isto é, fermentando apenas a xilose e todas foram capazes de desdobrar o tetrionato.

Quanto às amostras do lisotipo A, revelaram certas particularidades bioquímicas não muito comuns, quais sejam, de se classificar no biotipo I e serem desprovidas da tetrionato redutase. Embora esse pormenor de natureza bioquímica do lisotipo A possa ser considerado como discreto, em sua ocorrência normal, não é, no entanto, totalmente invulgar, pois em ensaios anteriores já foram consignadas culturas isoladas no município de São Paulo, com tal característica.

Com o recurso da verificação do comportamento das amostras diante dos fagos somáticos, possível se torna levantar a hipótese de relacionar a filiação das seis culturas, definidas como isentas do antígeno Vi, todas pertencentes ao mesmo tipo bioquímico (biotipo II), como prováveis remanescentes do lisotipo D₆.

Colocando em plano de discussão a forma pela qual o lisotipo D₆ tenha atingido as proporções de tal importância no surto epidêmico em estudo, pode-se considerar, em primeiro lugar, que obviamente entre os habitantes da região ou da circunvizinhança estiveram presentes portador ou portadores

deste lisotipo. Implica tal conjectura em advogar que talvez esses indivíduos tenham adquirido e desenvolvido a enfermidade sob uma forma assintomática, bem como é possível aventar a suposição de que se tenham infectado em outras regiões do país, ou mesmo, no estrangeiro. Por ora, todas essas circunstâncias detalhadas podem ser consideradas plenamente válidas, na tentativa de explicar o aparecimento do lisotipo D₆ que, até então, não tinha sido assinalado no município de São Paulo.

Em nosso meio, o lisotipo D₆ foi reconhecido apenas entre as amostras de bacilos típicos isolados em Salvador, Bahia, como foi dito anteriormente, apesar de que NICOLLE *et alii* ²⁷, com base em seus levantamentos da distribuição geográfica mundial, consideram-no como lisotipo semi-cosmopolita. Caracterizam ainda os autores supracitados que as áreas de maior incidência do lisotipo D₆ concentram-se no Japão, no extremo-oriental; Marrocos e Senegal, no continente africano, e Peru e Argentina, na América do Sul.

Também SCHOLTENS ³¹ descreve a presença freqüente do lisotipo D₆ nas amostras da Indonésia, inclusive tendo este fato uma extraordinária repercussão na fórmula de Lisotipia, determinada na Holanda, em razão dos antigos vínculos coloniais existentes entre essas regiões.

Relativamente ao comportamento bioquímico do lisotipo D₆, após consulta dos resultados encontrados por JUDE & NICOLLE ¹⁸ e PAVLATOU & NICOLLE ²⁹, que em síntese caracterizam-no como heterogêneo em suas reações, verificou-se, entretanto, que a maioria das amostras oriundas do extremo-oriental apresentaram uma maior tendência em se classificar no biotipo II.

Quanto aos resultados da caracterização bioquímica segundo Kristensen, tem-se ainda a destacar fundamentalmente a presença do biotipo I entre as amostras do tipo fágico A. Sem dúvida alguma esse detalhe, aliado a uma circunstância peculiar, que essas culturas demonstraram na sua incapacidade de desdobrar o tetrionato, constituíram-se em elementos de substancial importância para a sua nítida discriminação dos lisotipos e das formas restantes envolvidos no problema.

Em pertinência a esse aspecto, salienta-se, ainda, que em poucas ocasiões tais culturas foram identificadas no município de São Paulo, tendo como ponto contraditório, que a maioria dessas amostras teve como referência suas origens locais, muito distantes dentro do município, sem a menor conexão com o Parque Edú Chaves e suas áreas vizinhas.

Infere-se do exposto que as provas de natureza bioquímica propiciaram, com seus resultados, a possibilidade de estabelecer nitidamente as diferenças existentes nos três tipos fágicos caracterizados. Além disso, e de modo peremptório, orientaram extraordinariamente a concatenar o conceito de que as amostras individualizadas como Vi degradadas, e Vi negativas, representassem, em sua quase totalidade, seqüelas de um lisotipo ancestral, provavelmente o tipo D₆.

Finalmente, analisando os resultados obtidos nas determinações efetuadas nos antibiogramas, verificou-se que nenhuma das amostras evidenciou qualquer sinal de resistência ao cloranfenicol, ampicilina e heta-

cilina, fármacos rotineiramente utilizados na terapêutica da febre tifóide. É interessante discorrer sobre essa faceta, uma vez que, em período idêntico ao surto de São Paulo, ocorreu também no México uma epidemia de febre tifóide, de largas proporções e que se caracterizou pelo elevado número de culturas de *Salmonella typhi* resistentes a altas concentrações de cloranfenicol, tetraciclina e estreptomina ⁸.

Cumpra salientar que, curiosamente, este fenômeno da múltipla resistência do bacilo tífico foi, inicialmente, reconhecido e descrito por ANDERSON & SMITH ³, em duas amostras isoladas de ingleses que se contaminaram no México.

AGRADECIMENTOS

Aqui expressamos os nossos agradecimentos à Sta. Rosemary Ribeiro e aos Srs. Joel Antunes e Junair Ribeiro, pela colaboração prestada no desenvolvimento das tarefas auxiliares.

RIAL-A/400

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — On the bacteriological study of *Salmonella typhi* strains isolated during an epidemic outbreak of typhoid fever in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 53-67, 1974.

SUMMARY: From February to May 1972, 187 *Salmonella typhi* strains were isolated during an epidemic outbreak of typhoid fever in the São Paulo area. Such cultures were analysed from several standpoints such as a) serological, where they were classified as to the variation of Vi antigens; b) biochemical, where fermentative types were established, based on the reactions with xylose and arabinose plus the investigations of tetrathionate reductase; c) sensibility to antibiotics; d) classification by Vi-phage typing.

The results demonstrated a very unusual situation namely, the presence in an epidemic outbreak of typhoid fever, of three Vi-phage types: D₆, E1a and A, plus 2 biochemical types which are considered to be inadequate for determination with Vi II adapted phage types (Vi degraded strains and strains with no Vi antigens).

DESCRIPTORS: *Salmonella typhi*; typhoid fever (São Paulo); bacteriophage.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 53-67, 1974.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, E.S. — The significance of Vi-phage types F1 and F2 of *Salmonella typhi*. *J. Hyg. (Camb.)*, **49**: 458-70, 1951.
2. ANDERSON, E.S. & HOBBS, B.C. — Studies of the strain of *Salmonella typhi* responsible for the Aberdeen typhoid outbreak. *Israel J. med. Sci.*, **9**: 162-74, 1973.
3. ANDERSON, E.S. & SMITH, H.R. — Chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. *Br. med. J.*, **3**: 329-31, 1972.
4. ANDERSON, E.S. & WILLIAMS, R.E.O. — Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J. clin. Path.*, **9**: 94-127, 1956.
5. ASH, I.; MCKENDRICK, G.D.W.; ROBERTSON, M.H. & HUGHES, L.H. — Outbreak of typhoid fever connected with corned beef. *Br. med. J.*, **1**: 1474-78, 1964.
6. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. clin. Path.*, **45**: 493-6, 1966.
7. BERNARD, R.P. — The Zermatt typhoid outbreak in 1963. *J. Hyg. (Camb.)*, **63**: 537-63, 1965.
8. BESSUDO M., D.; OLARTE, J.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, P.; GALINDO, E.; CARRILLO, J.; GUTIÉRREZ-TRUJILLO, G. & KUMATE, J. — Aislamiento de *S. typhi* resistente a altas concentraciones de cloranfenicol. *Bolet. Of. sanit. pan-am.*, **74**: 1-6, 1973.
9. BRANDIS, H. — Zur Unterteilung des Typhusbakterientypes E. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. I, Orig.*, **162**: 223-4, 1955.
10. CRAIGIE, J. & BRANDON, K.F. — The laboratory identification of the V form of *B. typhosus*. *Can. Publ. Hlth J.*, **27**: 165-70, 1936.
11. CRAIGIE, J. & FELIX, A. — Typing of typhoid bacilli with Vi bacteriophage. *Lancet*, **252** (1): 823-7, 1947.
12. CRAIGIE, J. & YEN, C.H. — The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of Type II Vi phage. 1. Principles and technique. *Can. publ. Hlth J.*, **29**: 448-63, 1938.
13. FELIX, A. & CALLOW, B.R. — Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *Br. med. J.*, **2**: 127-30, 1943.
14. GALVAO, A.L.A.; MORAES, N.L.A.; BIRKHOLZ, L.B. & GARCEZ FILHO, J.M. — Sobre alguns elementos da estrutura epidemiológica da cidade de São Paulo no que se refere a doenças cujos agentes etiológicos se eliminam pelos excreta. *Archos Fac. Hyg. Saúde publ. Univ. S. Paulo*, **10**: 1-48, 1956.
15. HOFER, E. — Tipos bioquímicos de *Salmonella typhi*, de algumas regiões do Brasil. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, **6**: 157-62, 1972.
16. HOFER, E.; NOVAES, J.R.C. & PESSÓA, G.V.A. — Lisotipos e tipos fermentativos de *Salmonella typhi* isoladas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **32**: 7-15, 1972.
17. HOFER, E. & VICENTE, M.M.A. — Lisotipia Vi e classificação bioquímica de amostras de *Salmonella typhi* isoladas no Estado da Guanabara. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, **70**: 151-66, 1972.
18. JUDE, A. & NICOLLE, P. — Determination des types bactériophagiques (Vi-phage typing) et caractères biochimiques de souches de *Salmonella typhi* isolées dans les hopitaux militaires de la métropole et de certains territoires de l'Union Française. *Annls Inst. Pasteur (Paris)*, **77**: 550-60, 1949.
19. KAUFFMANN, F. — Über einen neuen serologischen Formenwechsel der Typhusbacillen. *Z. Hyg. InfektKrankh.*, **116**: 617-52, 1935.
20. KRISTENSEN, M. — Studies on the type division of the typhoid and paratyphoid B bacilli by fermentation. *J. Hyg. (Camb.)* **38**: 688-701, 1938.
21. KRISTENSEN, M. & HENRIKSEN, H.C.D. — Reactions fermentatives du bacille typhique et leur rôle épidémiologique. *Acta path. microbiol. scand.*, **3**: 551-82, 1926.
22. LANDY, M. — The visual identification of V and W form colonies in *Salmonella* cultures. *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*, **65**: 950-1, 1950.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A.; MORAIS, J.S.; MELLES, C.E.A.; COLNAGO, E.J.; LACERDA, M.D. & VILHENA, M.I. — Considerações sobre o estudo bacteriológico de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em um surto epidêmico de febre tifóide ocorrido no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 53-67, 1974.

23. LE MINOR, L.; CHIPPAUX, M.; PICHINOTY, F. COYNAULT, C. & PIÉCHAUD, M. — Méthodes simples permettant de rechercher la tétrathionate-réductase en cultures liquides ou sur colonies isolées. *Annls Inst. Pasteur* (Paris), **119**: 733-7, 1970.
24. LUTZ, A. — Reminiscencias da febre typhoide. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, **31**: 851-65, 1936.
25. LUTZ, A. — Reminiscences on typhoid fever. *Ibid* p. 867-8.
26. NICOLLE, P.; JUDE, A. & LE MINOR, L. — Relation entre l'intensité de l'irisation présentée par certaines colonies de *Salmonella* et leur constitution antigénique. *Annls Inst. Pasteur* (Paris), **78**: 572-82, 1950.
27. NICOLLE, P.; VIEU, J.F.; DIVERNEAU, G.; BRAULT, J. & KLEIN, B. — Utilisation en épidémiologie typhoïdique de la diversité des bacilles typhiques. II. Distribution géographique des lysotipes de *Salmonella typhi*. *Bull. Acad. Natn. Méd.*, **154**: 481-7, 1970.
28. PACHECO, G. An epidemic of typhoid fever due to polluted water. *Rev. Biol. Hyg.*, **3**: 112-9, 1932.
29. PAVLATOU, M. & NICOLLE, P. — Incidence des types biochimiques parmi les types bactériophagiques de *Salmonella typhi*. *Annls Inst. Pasteur* (Paris), **85**: 185-98, 1953.
30. SCHMID, A.W. — Contribuição para o estudo da epidemia de febre tifóide no Município de Itatiba em 1954. *Arq. Fac. Hig. Saúde Publ. Univ. S. Paulo*, **14**: 1-86, 1960.
31. SCHOLTENS, R. TH. — Phage typing of *Salmonella typhi* in the Netherlands. *Antonie van Leeuwenhoek*, **16**: 245-55, 1950.

Recebido para publicação em 6 de junho de 1974.

CARACTERÍSTICAS DA BUCLIZINA E DETERMINAÇÃO POR TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS *

Waldomiro PREGNOLATTO **
Narcildo Luiz PISSATTO ***

RIAL-A/401

PREGNOLATTO, W. & PISSATTO, N.L. — Características da buclizina e determinação por titulação espectrofotométrica em produtos farmacêuticos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 69-77, 1974.

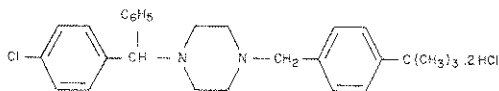
RESUMO: Descrevem-se neste artigo algumas características do dicloridrato de buclizina, um tranquilizante e anti-histamínico usado em composições farmacêuticas. Curvas de titulação e espectros de absorção da substância pura são apresentados.

Descreve-se, também, uma técnica para determinação da substância, quando livre, por simples titulação em meio não aquoso, com ácido perclórico e cristal violeta como indicador, e técnica para determinação por titulação espectrofotométrica, com ou sem purificação prévia por lavagem com éter dietílico, e por cromatografia em camada delgada e com leitura espectrofotométrica a 239 nm, em solução clorofórmica, ou 274 nm, em benzeno.

DESCRITORES: dicloridrato de buclizina, características; dicloridrato de buclizina, determinação espectrofotométrica em medicamentos; medicamentos, dicloridrato de buclizina.

I N T R O D U Ç Ã O

A buclizina é uma substância tranquilizante e anti-histamínica, cujo nome químico é 1-(p-tert-Butilbenzil)-4-(p-cloro α -fenilbenzil)piperazina. Comercialmente apresenta-se sob a forma de dicloridrato, com a seguinte fórmula estrutural:



Esta substância foi sintetizada inicialmente por MORREN¹ e, mais recentemente, por CHUAN-MING *et alii*². Suas propriedades físicas e químicas são muito pouco conhecidas; está inscrita no Index Merck, 8a ed., p. 172, onde encontramos que o ponto de fusão do dicloridrato é de 230 a 240°C e o da base livre é de 217 a 220°C, como descrito por MORREN, em sua patente.

Em relação aos métodos de dosagem, também pouco registra a literatura; CIACCIO *et alii*³ e RINK *et alii*⁷ verificaram que a substância é titulável em meio não

* Realizado no Departamento de Controle de Qualidade da Laboratil S.A. — Indústria Farmacêutica, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

*** Da Laboratil S.A. — Indústria Farmacêutica.

aquoso por ácido perclórico, verificando o primeiro que a buclizina apresenta um ponto de viragem em meio acético e dois em acetônitrila, comportando-se, em meio acético, como substância dibásica; apresenta, em seu trabalho, curvas de neutralização determinadas potenciométricamente. Rink *et alii* descrevem uma técnica para a mesma dosagem potenciométrica, e outra usando o cristal violeta como indicador, com o ponto de viragem para o azul, em meio benzeno-acético.

BLAZEK *et alii* ¹ separaram a buclizina de outros anti-histamínicos por cromatografia em coluna, depois de extrair a mistura, de preparados farmacêuticos, com álcool a quente, e titulação da base livre potenciométricamente com ácido clorídrico 0,1 N.

Uma tentativa de dosagem da buclizina por cromatografia em fase gasosa é descrita por SMITH & CARLSON ⁸, que transformaram a buclizina em éter trimetil-sílico, que é facilmente volatilizável e estável.

A literatura registra métodos para separação e identificação deste e de outros anti-histamínicos por cromatografia em camada delgada, em trabalhos elaborados por FIKKE ⁴, FIKKE & SUNSHINE ⁵, SUNSHINE *et alii* ⁹ & ZINGALES ¹⁰. Todos esses autores descrevem técnicas para a separação de uma série de anti-histamínicos, incluindo a buclizina, através de vários solventes. Reagentes para identificação e os R_f também são descritos.

Descrevemos em nosso trabalho algumas características e métodos para o controle do produto comercial e uma técnica para a determinação da buclizina em produtos farmacêuticos, tais como comprimidos, cápsulas e suspensões.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Características da buclizina

O produto comercial apresenta-se sob a forma de dicloridrato, o que é comprovado pela dosagem do cloro potenciométrica-

mente; é praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em álcool e em benzeno, solúvel em álcool a quente, e muito solúvel em clorofórmio. Purificada por recristalização em álcool-água, ou álcool-água em meio clorídrico, apresenta-se sempre como monocloridrato. A fig. 1 reproduz a curva de titulação do cloro no produto comercial e no recristalizado, onde se observa claramente a composição dos respectivos cloridratos*.

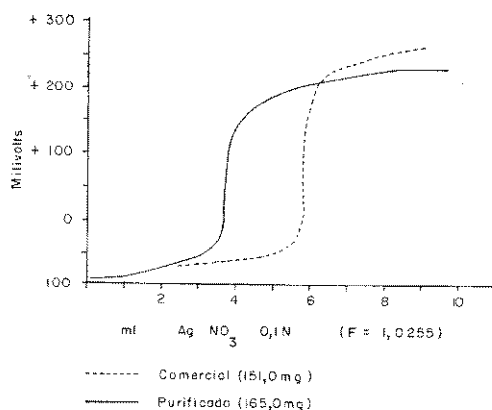


Fig. 1 — Dosagem de cloretos no dicloridrato de buclizina na amostra comercial e na purificada.

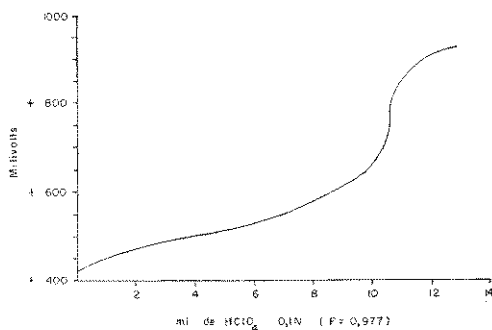


Fig. 2 — Titulação do dicloridrato de buclizina com ácido perclórico 0,1N (265,4 mg).

* Combi-titulador Methron.

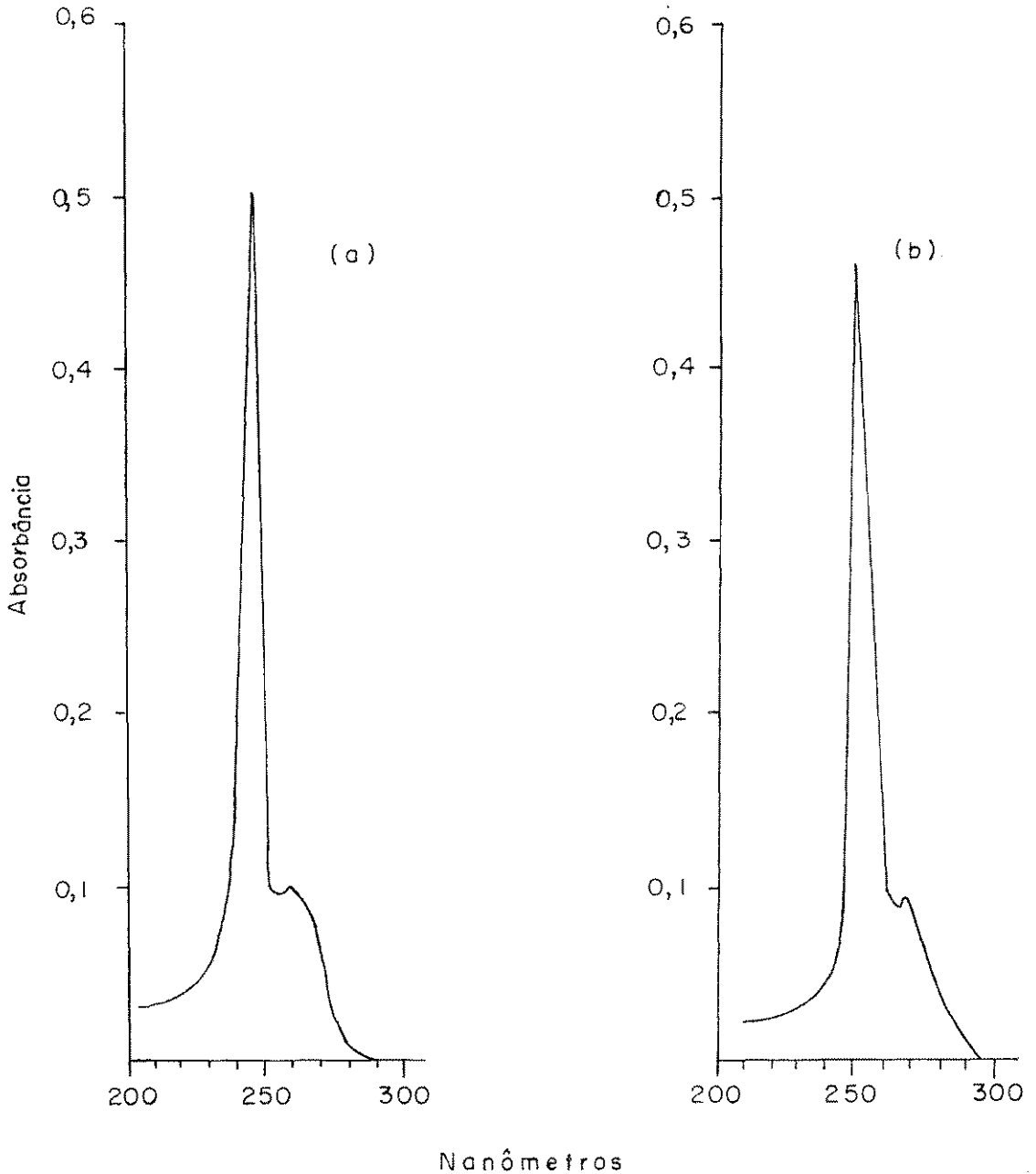


Fig. 3 — Absorbância do dicloridrato de buclizina (a) e monoclóridrato de buclizina purificada (b) em clorofórmio (50 µg/ml).

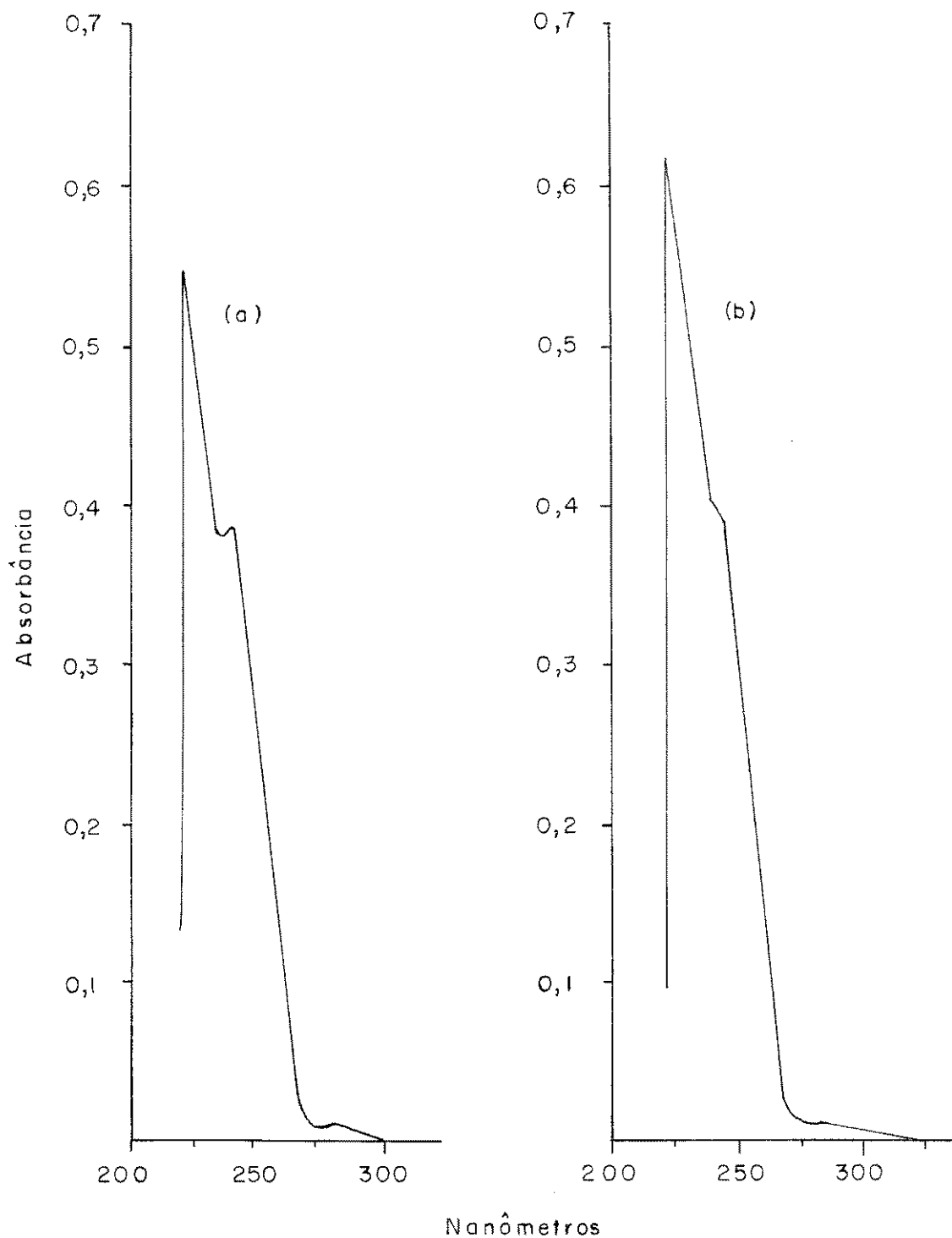


Fig. 4 — Absorbância do monoclórídato de buclizina (a) e do diclorídato de buclizina comercial (b) em álcool absoluto (25 µg/ml).

2. Métodos de determinação

A buclizina pode ser determinada por volumetria (titulação em meio não aquoso por ácido perclórico) ou por métodos espectrofotométricos; a fig. 2 reproduz a curva de titulação em meio não aquoso com ácido perclórico e a fig. 3 reproduz os espectros de absorção, em clorofórmio, do produto comercial e do recristalizado; ambos apresentaram máximo em 260 e 239 nm e mínimo em 225 nm, com $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 103,6$ e $95,6$ a 260 e 239 nm, respectivamente.

A fig. 6 reproduz o espectro no infravermelho do produto comercial, obtido em espectrofotômetro*, pastilha de Kbr. O ponto de fusão do produto comercial situa-se entre 210-225°C e o do purificado entre 232,5-247,5°C.

2.1 Determinação por titulação com ácido perclórico

Pese cerca de 0,250 g do produto, transfira para frasco de 300 ml, dissolva em 100 ml de ácido acético glacial previamente tratado com anidrido acético, adicione 10 ml de solução de acetato de mercúrio a 6% p/v em ácido acético, e 3 gotas do indicador cristal violeta a 1% p/v em ácido acético glacial.

Titule com ácido perclórico 0,1 N em solução acética até viragem para verde. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 25,297 mg de dicloridrato de buclizina.

2.2 Determinação espectrofotométrica em comprimidos, cápsulas e suspensões.

a) Em comprimidos e cápsulas

O teor de buclizina em especialidades farmacêuticas na forma de comprimidos e cápsulas contendo, além de buclizina, vitaminas B1, B2, B6, carnitina e nicotinamida, foi facilmente determinado por processo di-

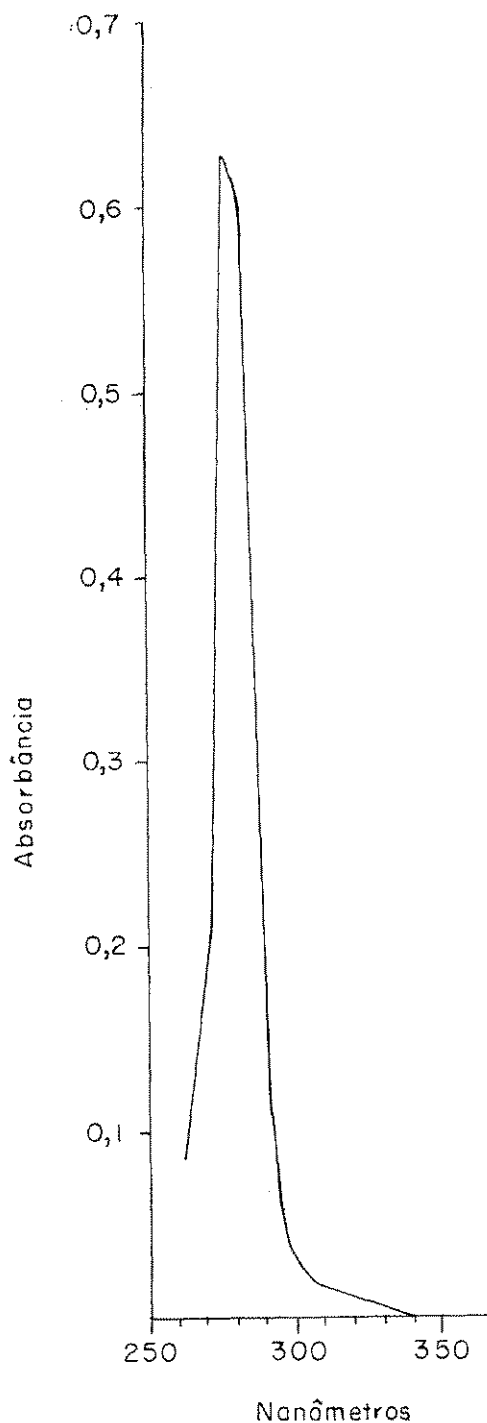


Fig. 5 — Absorbância da buclizina em benzeno (50 µg/ml).

* Perkin Elmer 187-B.

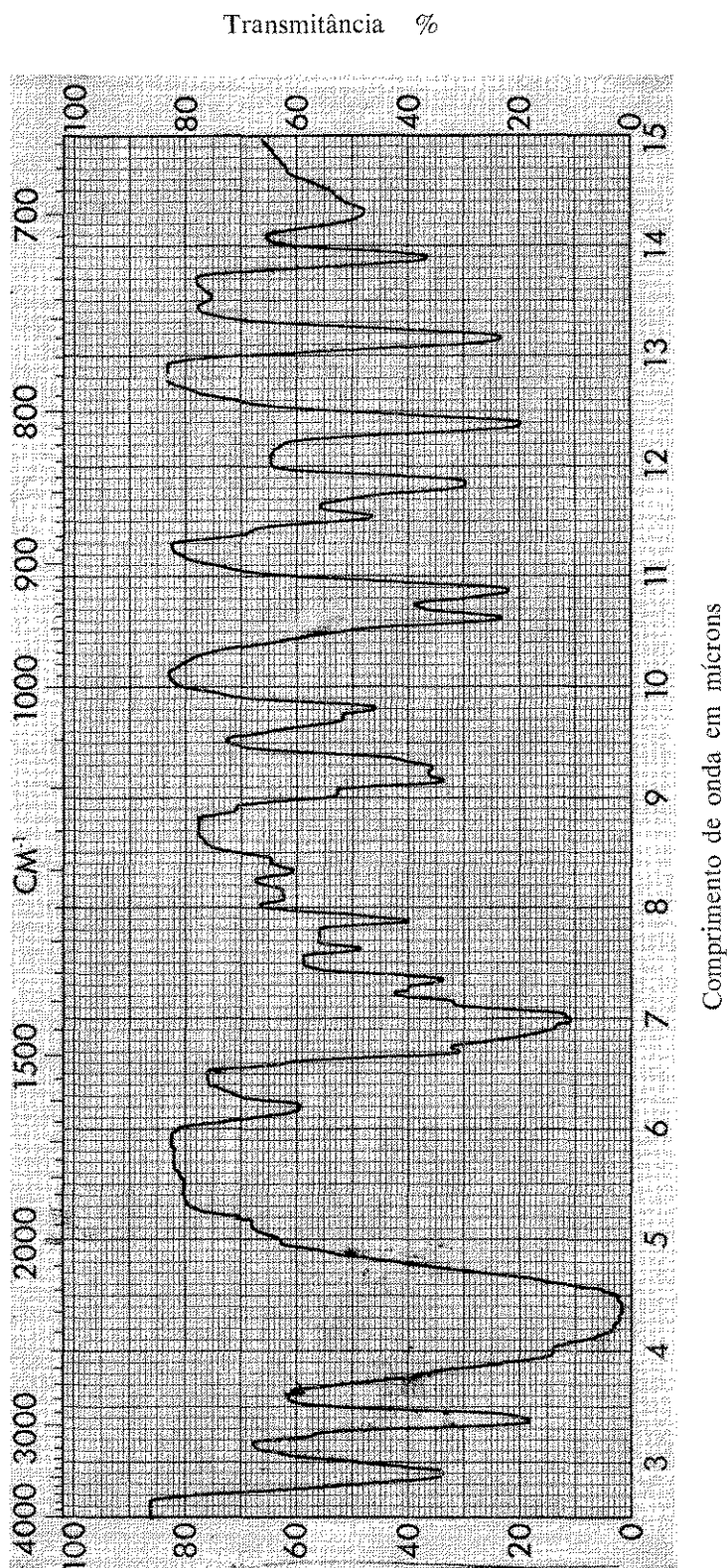


Fig. 6 — Espectro no I.V. do dicloridrato de buclizina (pastilhas de KBr).

reto de extração da buclizina com clorofórmio e leitura em espectrofotômetro*.

Foram triturados em almofariz 10 comprimidos de buclizina, ou o conteúdo de 10 cápsulas (12,5 mg de buclizina por unidade). Uma alíquota do pó contendo teoricamente 5 mg de buclizina foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e juntaram-se 50 ml de clorofórmio. Agitou-se fortemente o balão por cinco minutos, completou-se o volume com clorofórmio e homogeneizou-se. A solução foi, em seguida, filtrada por papel e a absorbância determinada em 239 nm, em cuba de 1 cm, e clorofórmio como branco.

Uma prova em branco foi inicialmente feita com a mistura das mesmas substâncias nas mesmas concentrações. A fig. 7 reproduz o perfil do extrato clorofórmico dessa mistura nas condições anteriormente descritas.

b) *Em suspensões*

Os preparados analisados continham, além da buclizina, carnitina, vitaminas B1, B2, B6, nicotinamida, ácido glutâmico, glicerofosfato de cálcio, conservadores, cloreto férrico. Nesse caso, o solvente ideal para a extração da buclizina foi o benzeno, por ser seletivo. Nenhuma purificação prévia foi necessária.

Uma alíquota do produto que continha teoricamente 5 mg de buclizina foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, juntaram-se 50 ml de benzeno e agitou-se fortemente por 10 minutos, completou-se o volume com benzeno, homogeneizou-se e filtrou-se. Determinou-se a absorbância a 274 nm, usando cuba de 1 cm e benzeno como branco. Cuidado especial foi tomado com as cubas, que devem ser do tipo de fechamento perfeito.

Em alguns casos de suspensões com fórmulas completamente desconhecidas, uma purificação prévia foi necessária. Umaz vezes, uma simples purificação por extração com éter dietílico foi suficiente; outras, purificação cromatográfica em camada delgada tornou-se necessária.

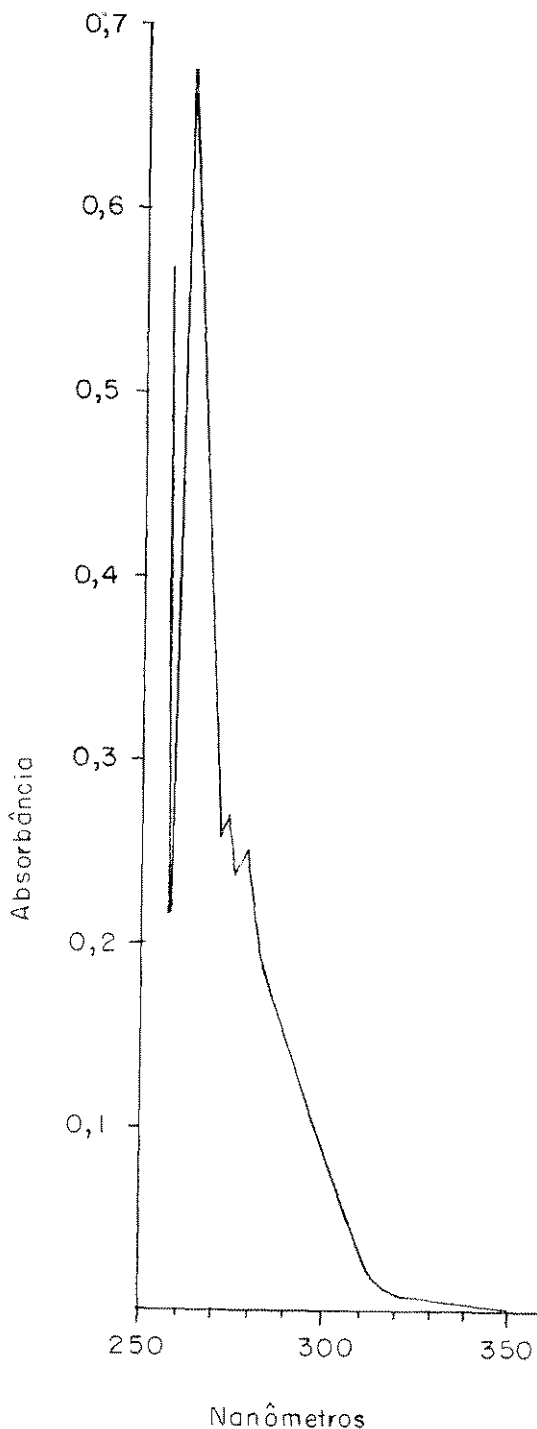


Fig. 7 — Absorbância do dicloridrato de buclizina em medicamentos (50 µg/ml).

* Varian, mod. 635 com registrador.

2.3 Purificação por cromatografia em camada delgada

A buclizina foi separada por cromatografia em camada delgada, usando-se o sistema IV, descrito por Zingales. A placa foi observada sob luz ultra-violeta e a mancha que apareceu a um Rf 0,89 foi raspada, eluída em clorofórmio e determinada espectrofotometricamente, como já descrito para comprimidos. Provas de recuperação por adição de quantidades conhecidas de buclizina em produtos desta classe foram feitas e a recuperação ficou situada ao redor de 98%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A buclizina, quando pura, pode ser facilmente dosada por titulação em meio acético com ácido perclórico, usando-se cristal violeta como indicador, tomando-se como ponto de equivalência a viragem para o verde. Essa afirmação se baseia em provas que efetuamos titulando a substância potenciometricamente em presença do indicador. Vê-se, na fig. 2, que o ponto de equivalência corresponde a 10,6 ml de ácido perclórico 0,1 N (F. 0,9779) para uma amostra de 265,4 mg e, exatamente neste ponto, o indicador virou para o verde.

Em misturas, a buclizina pode ser dosada por extração direta em benzeno ou clorofórmio e determinada espectrofotometricamente

ou, às vezes, a dosagem depende de uma prévia purificação, que tanto pode ser uma simples extração de interferentes com éter dietílico, ou separação cromatográfica.

Tentativas foram por nós feitas para a extração da buclizina, contida em produtos farmacêuticos, com etanol absoluto e posterior determinação espectrofotométrica. Apesar de trabalharmos com pequenas quantidades de substância, a extração etanólica nunca se mostrou quantitativa, quando comparada com as extrações clorofórmica ou benzênica. Devemos ainda acrescentar que, para misturas complexas, o benzeno, seguido do clorofórmio, mostraram-se sempre agentes de extração muito mais seletivos.

Usando a técnica descrita, determinamos a buclizina em uma série de produtos com ou sem fórmula completa conhecida, sempre com resultados satisfatórios. Na tabela abaixo estão relacionadas as diferentes classes desses medicamentos; os da classe A são produtos cuja composição completa não era conhecida e dos quais a buclizina foi extraída e determinada diretamente em clorofórmio, não necessitando purificação prévia cromatográfica; os da classe B são os mesmos produtos da classe A, mas que necessitam uma prévia purificação por cromatografia. Os da classe C são de fórmula completa conhecida, dos quais a buclizina foi extraída e determinada em benzeno. Os da classe D são de fórmula completa conhecida, nos quais a buclizina foi extraída e determinada diretamente em clorofórmio.

Teores de dicloridrato de buclizina em diferentes classes de medicamentos

Classe do produto	N.º de amostras	Teor de dicloridrato de buclizina		
		declarado mg/dose	médio encontrado mg/dose	Variação máximo-mínimo mg/dose
A	5	5,0	5,09	5,27 — 4,93
B	12	10,0	10,10	10,22 — 9,84
C	25	5,0	4,94	5,01 — 4,75
D	5	12,5	13,14	13,9 — 12,50

RIAL-A/401

PREGNOLATTO, W. & PISSATTO, N.L. — On the characteristics of buclizine dihydrochloride and its detection through spectrophotometric titration. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 69-77, 1974.

SUMMARY: Some characteristics of the buclizine dihydrochloride, a tranquilizer and anti-histaminic agent used in pharmaceuticals, are described in this work. Titration curves and absorption spectra of the plain substance are also shown herein.

It is described as well a technic for detecting the substance, when free, through a simple titration with perchloric acid in a non-aqueous medium and violet crystal as indicator. Further it is described a technic for detecting the substance through spectrophotometric titration with or without previous purification by diethyl ether washing, and through thin-layer chromatography, with absorbance readings either at 239 nm in chloroformic solution or at 274 nm, in benzene.

DESCRIPTORS: buclizine dihydrochloride, characteristics; buclizine dihydrochloride, spectrophotometric determination in pharmaceuticals; pharmaceuticals, buclizine dihydrochloride.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLÁZEK, J.; MARES, V. & STEJSKAL, Z. — Determination of some new antihistamines by a chromatographic ion-exchange method. *Ceskosl. Farm.*, 6 (3): 150-1, 1957 apud *Analyt. Abstr.*, 5: 1683, 1958.
2. CHUAN-MING, L.; I-CHENG, Y. LIN-YING, L. — Preparation of buclizine hydrochloride. *Ydo Hsueh Hsueh Pao*, 18 (8): 317-20, 1964 apud *Chem. Abstr.*, 62: 2776b, 1965.
3. CIACCIO, L.L.; MISSAN, S.R.; McMULLEN, W.H. & GRENFELL, T.C. — Non-aqueous titration of 1,4-disubstituted piperazines. *Analyt. Chem.*, 29: 1670-3, 1957.
4. FIKE, W. — Structure-Rf correlation in the thin layer chromatography of some basic drugs. *Analyt. Chem.*, 38: 1697-1702, 1966.
5. FIKE, W.W. & SUNSHINE, I. — Identification of antihistamines in extracts of biological materials using thin layer chromatography. *Analyt. Chem.*, 37: 127-9, 1965.
6. MORREN, H.G. — Analkyperazines, apud *Chem. Abstr.*, 49: 2527h, 1955.
7. RINK, M. & RIEMHOFER, M. apud KUCHARSKY, J. & SAFARIK, L. — *Titrations in non aqueous solvents*. Translation Karel Sumbera. Amsterdam, Elsevier, 1965. p. 187.
8. SMITH, B. & CARLSON, O. — Gas chromatographic analysis of polyhydric organic compounds. *Acta chem. scand.*, 17: 455-60, 1963 apud *Chem. Abstr.* 59: 3294a, 1963.
9. SUNSHINE, I.; FIKE, W.W. & LANDESMAN, H. — Identification of therapeutically significant organic bases by thin-layer chromatography. *J. forens. Sci.*, 11 (3): 428-39, 1966 apud *Chem. Abstr.* 66: 16972s, 1967.
10. ZINGALES, I. — Sistematic identification of psychotropic drugs by thin-layer chromatography. Part I. *J. Chromat.*, 31: 405-19, 1967.

Recebido para publicação em 17 de junho de 1974.

MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SORBITOL POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA *

Walkyria H. LARA **
Helena Y. YABIKU **

RIAL-A/402

LARA, W.H. & YABIKU, H.Y. — Método para identificação de sorbitol por cromatografia em camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 79-81, 1974.

RESUMO: É descrito um método de cromatografia em camada delgada para identificação do sorbitol, em presença de seus possíveis contaminantes (manitol, maltose, glicose, xilose, frutose, sacarose). O solvente é uma mistura de água, propanol e acetato de etila e o revelador, uma solução de permanganato de potássio.

O método detecta até 0,5 µg/ µl de sorbitol e separa nitidamente até 5% de manitol em sorbitol.

DESCRITORES: sorbitol, identificação; cromatografia em camada delgada, na identificação e separação do sorbitol.

I N T R O D U Ç Ã O

Sorbitol é empregado como aditivo para alimentos; tem o uso em balas e produtos similares, em recheios e revestimentos de produtos de confeitaria e em produtos dietéticos, regulamentado pela atual legislação². Como umectante, mantém condições de umidade que impedem a cristalização do açúcar, tornando maior o período em que certos doces ficam armazenados. Nos produtos dietéticos, é empregado porque, tendo o mesmo valor calórico que o do açúcar, é entretanto assimilado mais vagarosamente no trato intestinal, devido a se transformar mais em frutose que glicose sob a ação das enzimas hepáticas¹.

Quimicamente é um hexahidroálcool, encontrado na natureza em frutas de rosáceas

(pera, maçã, pêssego, ameixa). Foi isolado, em 1872, por J. Boussingault de uma fruta das montanhas (espécie *Sorbus*). Após a introdução, em 1937, de métodos de obtenção por redução eletrolítica da glicose e, mais recentemente, por hidrogenação catalítica de glicose ou de açúcar invertido, passou a ser produto bastante acessível e utilizado em maior escala: novos produtos a ele relacionados, as sorbitanas (Spans), são misturas de ésteres de sorbitol com ácidos graxos e também são utilizados na tecnologia de alimentos.

Sorbitol pode apresentar vários contaminantes ligados ao tipo de obtenção. Assim, manitol, glicose, sacarose e frutose são possíveis contaminantes de sorbitol.

A prova qualitativa para sorbitol, constante da Farmacopéia Americana³, baseada

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

no ponto de fusão do derivado benzelidênico, além de demorada, não distingue as impurezas potenciais.

Uma revisão dos métodos analíticos foi feita em 1971 por EGAN & COLLINS⁵. Outros métodos de identificação de sorbitol, tais como cromatografia de papel⁶, e gás⁷, são bons mas demorados, sendo que as técnicas de cromatografia em camada delgada oferecem vantagem pela rapidez e simplicidade. Muitos têm sido os sistemas em camada delgada propostos ultimamente, variando os adsorventes e solventes empregados. Em alguns casos, agentes complexantes foram usados para modificar o adsorvente. DE SIMONE & VICEDONIMO⁴ propuseram o uso de um meio alcalino e nitrato de chumbo II para a separação dos poliálcoois. COLES JR. & UPTON⁸ usam água como fase móvel em placas de sílica gel G, enquanto que TICKHOMIRA *et alii*⁹ empregam placas com CaSO₄ e ácido sulfúrico (1:1) como revelador.

Investigando a aplicação destes métodos e comparando-os, introduzimos modificações em relação à fase móvel e tratamento prévio da placa. Resultou um método não só para identificação do sorbitol, como capaz de separar os seus possíveis contaminantes, simples e rápido.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Aparelho para preparação de placas para cromatografia em camada delgada

Placas de vidro de 20 x 20 x 0,3 cm para C. C. D.

Cuba de vidro para C. C. D.

Sílica Gel G (tipo 60)*

Solução de tetraborato de amônio a 1%

Solvente: propanol — acetato de etila — água (3:2:5)

No momento de usar, adicionar 0,1 ml de hidróxido de amônio para cada 100 ml da mistura.

Revelador: solução de permanganato de potássio a 0,35% em hidróxido de sódio 1 N

Soluções padrão de poliálcoois

Solução a 0,1% de sorbitol, manitol, maltose, glicose, xilose, frutose, sacarose

Preparação das placas

Agitar vigorosamente sílica gel com água, na proporção de 12 g para 24 ml e aplicar às placas de vidro na espessura de 250 μ . Secar ao ar, de 10 a 15 minutos e depois deixar 30 minutos em estufa a 110°C. Retirar da estufa, resfriar ao ar e imediatamente pulverizar com a solução de tetraborato de amônio a 1%. Secar ao ar e usar.

Procedimento

Aplicar alíquotas de 5 μ l das soluções padrão de manitol, sorbitol, frutose, glicose, maltose, xilose, sacarose e da amostra preparada. Correr com o solvente até atingir aproximadamente 14 cm de altura na placa. Retirar da cuba e secar à temperatura ambiente. Pulverizar com o revelador. Os poliálcoois (sorbitol, manitol) aparecem como manchas amarelas sobre fundo rosa. Com o tempo, tornam-se brancos sobre fundo castanho claro.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Com o procedimento acima descrito conseguiu-se ótima separação dos contaminantes usuais do sorbitol, o que é evidenciado pelos valores de Rf que são dados na tabela seguinte, que correspondem à média de valores obtidos em sete diferentes corridas:

Valores de Rf x 100 de sorbitol e contaminantes potenciais

Poliálcoois	Rf x 100
Sorbitol	33
Manitol	41
Frutose	46
Xilose	54
Glucose	64
Maltose	69
Sacarose	75

Este método identifica e separa até 5% de manitol em sorbitol e serve à identificação de sorbitol até 0,5 μ g/ μ l.

* Merck

Comparado aos métodos de cromatografia em camada delgada descritos na literatura, este apresenta vantagens quanto ao revelador que é uma solução de fácil obtenção. Em relação ao método de Coles & Upton, que usa igual revelador, apresenta a vantagem do solvente.

CONCLUSÃO

O método proposto é simples e específico, servindo ao controle da presença de sorbitol, em produtos de confeitaria e dietéticos, ao mesmo tempo que o distingue de outros possíveis poliálcoois e açúcares.

RIAL-A/402

LARA, W.H. & YABIKU, H.Y. — Thin-layer chromatography method for identification of sorbitol. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 79-81, 1974.

SUMMARY: A thin-layer chromatography method for identification and separation of sorbitol from its contaminants (mannitol, maltose, glucose, xylose, fructose, sucrose) is described.

The solvent used is a mixture of water, propanol and ethyl acetate and the spray reagent is a solution of potassium permanganate.

Method detects up to 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of sorbitol and clearly separates up to 5% of mannitol from sorbitol.

DESCRIPTORS: sorbitol, identification and separation; thin-layer chromatography, identification and separation of sorbitol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLACKLEY, R.L. — The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, **49**: 257-71, 1951.
2. BRASIL. Leis, decretos etc. — Decreto-lei n.º 55.871 de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n.º 50.040 de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n.º 691 de 13 de março de 1962. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 9 abr. 1965.
3. COLES JR., Z.A. & UPTON, R.P. — Thin-layer chromatographic identification test for sorbitol and sorbitol solution. *J. Ass. offic. analyt. Chem.*, **55**: 1004-5, 1972.
4. DE SIMONE, V. & VICEDONIMI, M. — The separation of polyols by thin-layer chromatography. *J. Chromat.*, **37**: 538-41, 1968.
5. EGAN, H. & COLLINS, H.J. — Survey of analytical methods available for the estimation of some food additives in food. *Pure appl. Chem.*, **26**: 113-4, 1971.
6. HAUSE, J.A.; HUBICKI, J.A. & HAZER, G.G. — Determination of sorbitol as its hexacetate by gas liquid chromatography using an ionization detector. *Analyt. Chem.*, **34**: 1567-70, 1962.
7. GENEST, C. & CHAPMAN, D.G. — Extraction and identification of sugar alcohols and other carbohydrates in dietetic foods. *J. Ass. offic. agric. Anal.*, **45**: 422-4, 1963.
8. PHARMACOPEIA of the United States of America. 18th rev. [Easton, Pa., Mack Printing, c1970. p. 673-680.
9. TICKHOMIRA, G.P. & KALITY VAUSKA, V.I. — Thin-layer chromatographic analysis of sorbitol-mannitol mixtures in the product obtained by hydrogenation of glucose for the manufacture of sorbitol. *Ukr. Khim. Zh.*, **38** (11): 1166-8, 1972 apud *Analyt. Abstr.* **25** (3): 1921, 1973.

Recebido para publicação em 26 de junho de 1974.

NOTAS SOBRE ALGUNS PARASITAS DE RATOS SILVESTRES DO
ESTADO DE SÃO PAULO *

Samuel B. PESSÓA **

RIAL-A/403

PESSÓA, S.B. — Notas sobre alguns parasitas de ratos silvestres do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 82-93, 1974.

RESUMO: É assinalado o encontro em ratos silvestres, do Estado de São Paulo, Brasil, dos seguintes parasitas:

1. *Entamoeba histolytica*, em 3 espécies de *Oryzomys*, determinando lesões do intestino grosso;
2. *Hepatozoon* sp., encontrado em esfregaço de medula óssea, também em espécie do gênero *Oryzomys*.
3. *Haemobartonella muris*, no sangue de várias espécies dos gêneros *Oryzomys*, *Nectomys* e *Clyomys*. No sangue de *Nectomys squamipes*, além da *Haemobartonella muris*, foi encontrado o *Eperythrozoon* sp.
4. Em esfregaços de sangue do *Proechmys iheringi*, foi encontrado *Trypanosoma renjifo* Deane, 1961.
5. No pulmão do *Akodon (Thaptomys) nigrita* foi encontrada uma larva do 6.º estágio do *Porocephalus crotali*.

DESCRITORES: parasitas em ratos silvestres; ratos silvestres (São Paulo); *Akodon (Thaptomys) nigrita*; *Clyomys* sp.; *Nectomys* sp.; *Nectomys squamipes*; *Oryzomys* sp.; *Proechmys iheringi*; *Entamoeba histolytica*; *Eperythrozoon* sp.; *Haemobartonella muris*; *Hepatozoon* sp.; *Porocephalus crotali*; *Trypanosoma renjifo* Deane, 1961.

I N T R O D U Ç Ã O

Graças à boa vontade do Dr. Oscar S. Souza Lopes, Chefe da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz, realizamos algumas pesquisas sobre parasitas de ratos capturados no campo, para estudo daquela Seção.

As nossas observações limitaram-se quase exclusivamente à pesquisa de hemoparasitas dos roedores, dos quais examina-

mos o sangue de cerca de 500, e o sangue e a medula óssea de cerca de 200. Separamos alguns que nos pareceram doentes, para a pesquisa de protozoários intestinais e foi ocasionalmente que encontramos em um deles uma larva de *Porocephalus crotali*, no pulmão.

Pensamos ser agora oportuno relatar estes trabalhos, por não termos a intenção de prosseguí-los.

* Realizado na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Assistente voluntário do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ratos silvestres foram capturados em diversas estações de campo mantidas pela Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos; o sangue foi extraído assépticamente do coração e feitos esfregaços em lâminas; na mesma ocasião foram feitos esfregaços da medula óssea; o material era em seguida fixado pelo metanol e corado pelo Giemsa. Em relação às fezes, foram examinadas a fresco e após coloração pelo lugol; havendo indicação, eram fixadas pelo líquido de Schaudinn e coradas pela hematoxilina férrica. Fragmentos de órgãos parasitados eram fixados no formol a 10% ou no fixador de Bouin, incluídos em parafina para cortes histológicos.

RESULTADOS

1. Amebíase espontânea de ratos silvestres do gênero *Oryzomys*, pela *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903.

É bem conhecido o fato de o rato caseiro ou ratazana (*Rattus rattus*) sofrer espontaneamente de disenteria amebiana semelhante à que ocorre no homem. Foi LYNCH¹³ um dos primeiros pesquisadores a encontrar o *Rattus rattus* com disenteria amebiana espontânea. O parasita dos murídeos, nestes casos, não se distingue da *E. histolytica* e JONES¹¹ servia-se destes animais infetados no laboratório para pesquisas farmacológicas de substâncias amebicidas. NEAL¹⁴, por sua vez, empregou o rato para o estudo da virulência das diversas raças da *E. histolytica*.

Mas, o encontro de ratos silvestres, apresentando espontaneamente um síndrome de disenteria amebiana com a *E. histolytica* nas fezes, parece-nos não ter sido relatado entre nós; no estrangeiro tem sido assinalada, com certa frequência, a infecção espontânea de ratos caseiros pela *E. histolytica*, porém não conseguimos achar o registro de ratos silvestres sofrendo de disenteria amebiana espontânea.

É por isso que julgamos de interesse o relato do encontro de três ratos silváticos do gênero *Oryzomys* (a espécie não foi determinada), todos os três capturados no campo, no local denominado "Floresta Es-

tadual de Itapetininga", situado a cerca de 18 km desta localidade. Um exemplar foi capturado em 9 de outubro de 1973 (n.º 25.718) e dois outros em 19 do mesmo mês e ano (n.º 25.940 e 25.941). O fato de apresentarem disenteria e sangue nas fezes levou-nos ao seu exame parasitológico, com o encontro de amebas com os caracteres da *E. histolytica*, com formas vegetativas e císticas nas fezes de todos eles (fig. 1, 4, 5 e 7).

Examinamos a mucosa do intestino grosso e em todos encontramos ulcerações superficiais da região em apreço; pelo exame histológico verifica-se a necrose da camada glandular (ratos 25.940 e 25.941, fig. 6 e 8), até o córion, e nas fig. 2 e 3 percebe-se uma ameba na porção superficial da mucosa do grosso intestino que se mostra erodida e necrosada (rato 25.718). O fígado de todos os exemplares apresentava-se aparentemente normal.

Vê-se, por conseguinte, que nos três roedores as lesões encontradas nas infecções espontâneas são também de natureza superficial, como tem sido assinalado por vários autores em relação às infecções experimentais (FAUST⁸).

Como foi relativamente pequeno o número de exemplares de ratos por nós examinados para a pesquisa de lesões amebianas, é de causar surpresa o encontro destes três animais com parasitismo tão notável pela *E. histolytica*. Pensamos que este é um campo digno de maiores pesquisas, pois é bastante obscura a fonte de infecção de ratos silváticos, capturados longe de qualquer habitação humana, por raça de *E. histolytica* de virulência bastante evidente. Deve-se também levar em consideração os antigos, porém importantes, trabalhos de LYNCH¹³ e CHIANG² sobre a possibilidade de os ratos (os autores se referem aos ratos das cidades) se comportarem como portadores ativos da *E. histolytica* e por conseguinte como disseminadores da amebíase.

Finalmente queremos observar que ratos silvestres são frequentemente parasitados pela *Entamoeba muris*, espécie não patogênica e própria de murídeos. Examinamos vários roedores assim parasitados sem nunca encontrarmos lesões do intestino, como as anteriormente descritas.

2. *Hepatozoon* sp., do *Oryzomys* sp.

Apesar de termos examinado o sangue e medula óssea de um total de 700 murídeos silvestres (de 500 o sangue e de 200 o sangue e a medula óssea), somente encontramos um único com *Hepatozoon* na medula óssea. Tratava-se de um *Oryzomys* sp. capturado na Floresta Estadual de Itapetininga. O parasita achava-se situado no interior de um polimorfonuclear da medula óssea, dando a impressão de estar na divisão (fig. 9 e 10). Esta raridade de hemoparasita mostramos a falta de transmissor entre os ratos silvestres; quanto à espécie do *Hepatozoon*, não nos foi possível determiná-la, pois atualmente se admitem várias espécies do esporozoário parasitando murídeos (KUDO¹², 1962), como por exemplo o *H. muris* (Balfour, 1905), o *H. musculi* (Porter, 1907), etc. A transmissão de rato a rato (*Mus norvegicus* e *Mus rattus*) se dá por intermédio do *Echinolaelaps echidninus*.

3. *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*

Infecções naturais pela *Haemobartonella muris* (Mayer, 1921), foram por nós encontradas em várias espécies de ratos silvestres, como no *Nectomys squamipes*, capturado no Rio Guaratuba; no *Oryzomys* sp. no *Clyomys laticeps*, capturados na Floresta do Estado, Itapetininga (fig. 11 e 12).

Também no rato *Nectomys squamipes* diagnosticamos um parasita do sangue que nos parece ser o *Eperythrozoon* sp. (Fig. 13).

Como se sabe, a diferenciação morfológica deste parasita para com a *Haemobartonella* é difícil e se baseia, segundo GRIESEMER⁹, principalmente no fato de este último hemoparasita não possuir forma ovóide ou em anel (fig. 13). Aliás, o *Eperythrozoon* foi visto unicamente no *Nectomys squamipes*, ao contrário da *Haemobartonella* que foi encontrada em várias espécies de murídeos. Assim é que CARINI & FONSECA¹, em 1943, registraram o encontro de Grahamellas em exemplares de *Nectomys squamipes*, capturados em São Paulo, e em exemplares de *Oryzomys* sp. provenientes de Minas Gerais.

4. *Trypanosoma* do *Proechmys iheringi* (*Trypanosoma renjifo* Deane, 1961).

DEANE^{4, 5} descreveu este tripanosoma em um rato do gênero *Proechmys* da região amazônica brasileira (*Proechmys cayennensis*).

Anteriormente, RENJIFO & MOIBE¹⁶ assinalaram, porém sem dar nome, um tripanosoma, provavelmente idêntico ao *T. renjifo*, parasitando outra espécie do mesmo gênero de ratos, o *Proechmys guyanensis*, da Colômbia.

O nosso esfregaço de sangue foi examinado por Deane que confirmou o diagnóstico.

As dimensões dos nossos exemplares nos parecem um pouco menores do que as médias dadas por HOARE¹⁰ para a espécie pois alcançaram no máximo 23 microns de comprimento. Também notamos que os tripanosomas nos esfregaços parecem ter a tendência de se colocar em fileiras de 2 e 3 organismos (fig. 14 e 15).

Devemos notar que, apesar de termos examinado o sangue de mais de 700 ratos selvagens, somente encontramos um animal (*Proechmys iheringi*) parasitado por tripanosomas. Parece-nos que isto vem mostrar, como acentuamos anteriormente, a falta de ectoparasitas transmissores, provavelmente pulgas, nos ratos silvestres de São Paulo.

5. Larva de *Porocephalus crotali* (Humboldt, 1808): Pentastomida, no pulmão do rato silvestre — *Akodon* (*Thaptomys*) *nigrita*.

No pulmão de um rato selvagem — *Akodon* (*Thaptomys*) *nigrita* — capturado em Casa Grande (Reserva do Rio Claro), no Município de Salesópolis (murídeo n.º 21.856), encontramos no pulmão uma larva dentro de uma cápsula, que identificamos como sendo larva de 6.º estágio do *Porocephalus crotali* (fig. 16). A identificação desse organismo foi facilitada pelo excelente trabalho de ESSLINGER⁶ que nele estuda minuciosamente o desenvolvimento do *P. crotali*. Este 6.º estágio constitui a larva infecciosa, a qual sendo ingerida pelo hospedeiro definitivo (em geral uma serpente) transforma-se, no pulmão do ofídio, no verme adulto. A ninfa do 6.º estágio é encontrada encapsulada, e se acha dentro da cápsula enroliada

sobre si mesma, de modo que as extremidades anterior e posterior se tocam. Quando a cápsula é fendida a ninfa se liberta, e torna-se bastante ativa. O comprimento do corpo da nossa ninfa, livre, é de cerca de 12 mm e a espessura no centro do corpo, de 1,5 mm. Os ganchos bucais têm a mesma aparência dos do adulto do *Porocephalus*. O pulmão do rato não se apresentou muito lesado conforme se pode ver pelas microfotografias (fig. 17 e 18). O parênquima mostra-se congestionado e pode-se notar a existência de uma pequena infiltração ao redor dos bronquíolos. Pode-se assinalar uma pequena área hemorrágica no ápice do pulmão (fig. 17).

Por conseguinte, fica assinalado o encontro de uma ninfa do *P. crotali* no pulmão de um rato selvagem do Estado de São Paulo. Ao que nos consta, até hoje no Brasil, apesar de terem sido evidenciados frequentemente os parasitas adultos em serpentes, seus hospedeiros intermediários têm sido menos encontrados. Recentemente REGO e VICENTE¹⁵ relataram o encontro de formas evolutivas do *P. crotali* no fígado do quati (*Nasua narica*) e citam que L. Travassos (1943) o encontrou na cuíca (*Chiromyces minimus*). Como não temos conhecimento de terem sido encontradas larvas de *Porocephalus crotali* em espécies de ratos silvestres do gênero *Akodon*, julgamos justificada a publicação desta nota.

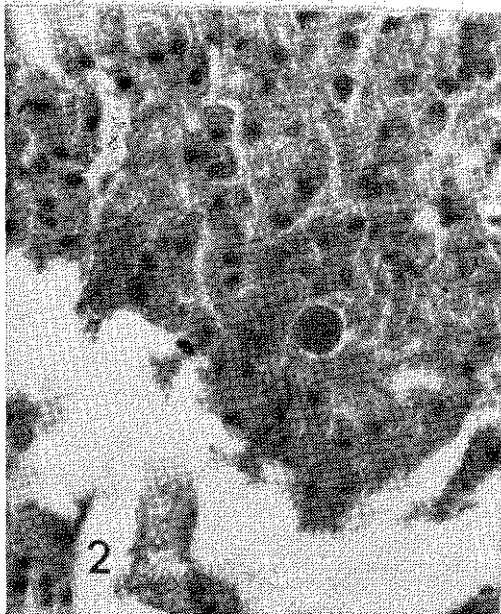
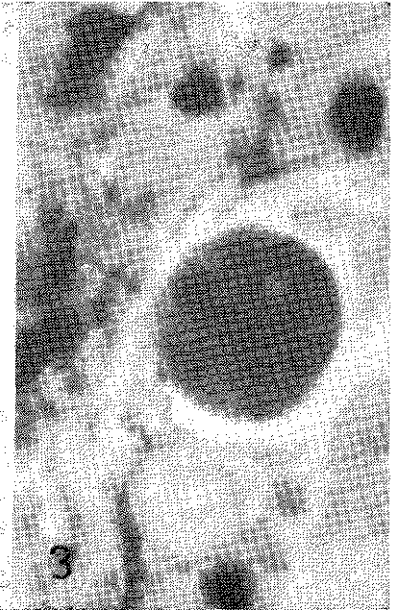


Fig. 1 — *Entamoeba histolytica* (forma vegetativa) — Intestino do *Oryzomys* sp. (n.º 25.718); notar as duas hemáceas fagocitadas no interior da ameba e o pseudópode no lado esquerdo da microfotografia, 1.000 X. (Coloração hematoxilina-férrica).

Fig. 2 — Corte do intestino do *Oryzomys* sp. (n.º 25.718). Notar descamação e erosão glandular; no tecido vê-se uma ameba. (Coloração hematoxilina-eosina).

Fig. 3 — O mesmo, com maior aumento (1.000 X), para mostrar a ameba.

- Fig. 4 — *E. histolytica* (forma vegetativa) — Intestino do *Oryzomys sp.* (n.º 25.940); notam-se os pseudópodos grossos. (Coloração hematoxilina férrica).
- Fig. 5 — *E. histolytica* (forma cística) — *Oryzomys sp.* (n.º 25.940); cisto com um núcleo, 1.000 X. (Coloração Lugol).
- Fig. 6 — Corte do intestino de *Oryzomys sp.* (n.º 25.940). Segmento normal, para comparar com o segmento lesado. (Coloração hematoxilina-eosina).
- Fig. 7 — *E. histolytica* (forma cística) — *Oryzomys sp.* (n.º 25.941) 1.000 X. (Coloração pelo lugól).
- Fig. 8 — Corte do intestino do *Oryzomys sp.* (n.º 25.941), para mostrar necrose com formação de úlcera superficial. (Coloração hematoxilina-eosina).

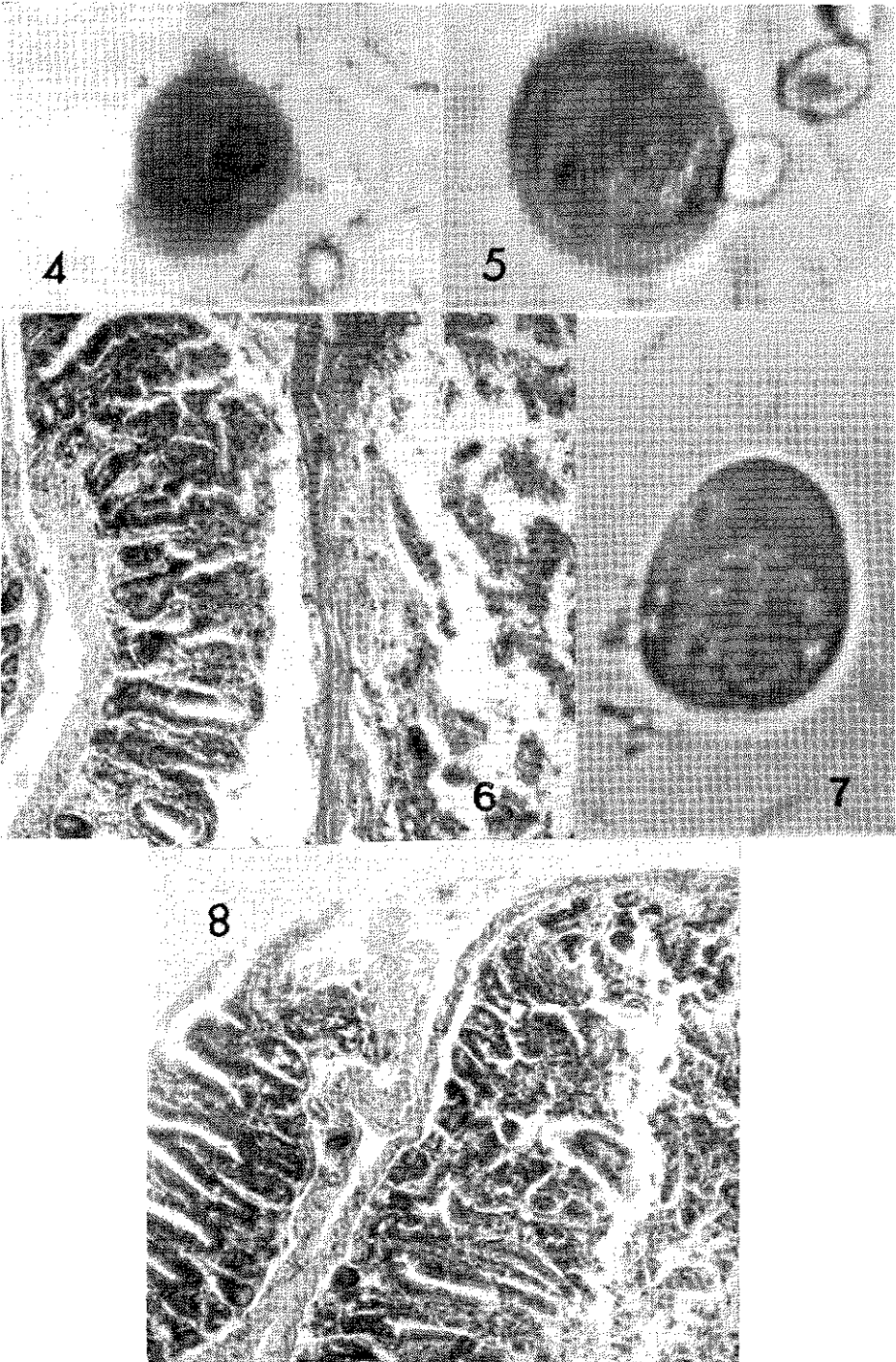


Fig. 9 — *Hepatozoon* sp. — Medula óssea do *Oryzomys* sp., 1.800 X (Coloração Giemsa).

Fig. 10 — O mesmo organismo com aumento maior, 3.000 X.

Fig. 11 — *Haemobartonella muris*, do *Nectomys squamipes*, rato, 1.800 X. (Coloração Giemsa).

Fig. 12 — *Haemobartonella muris*, do *Clyomys laticeps*, 3.000 X. (Coloração Giemsa).

Fig. 13 — *Eperythrozoon* sp., do rato *Nectomys squamipes*, 1.000 X. (Coloração Giemsa).

Fig. 14 — *Trypanosoma renjifo* Deane, 1961, do rato *Proechmys iheringi*, no sangue periférico, 1.800 X. (Coloração Giemsa).

Fig. 15 — Outra microfotografia do *T. renjifo* no sangue do rato *Proechmys iheringi*, para mostrar a tendência que têm em se colocar em fileira.

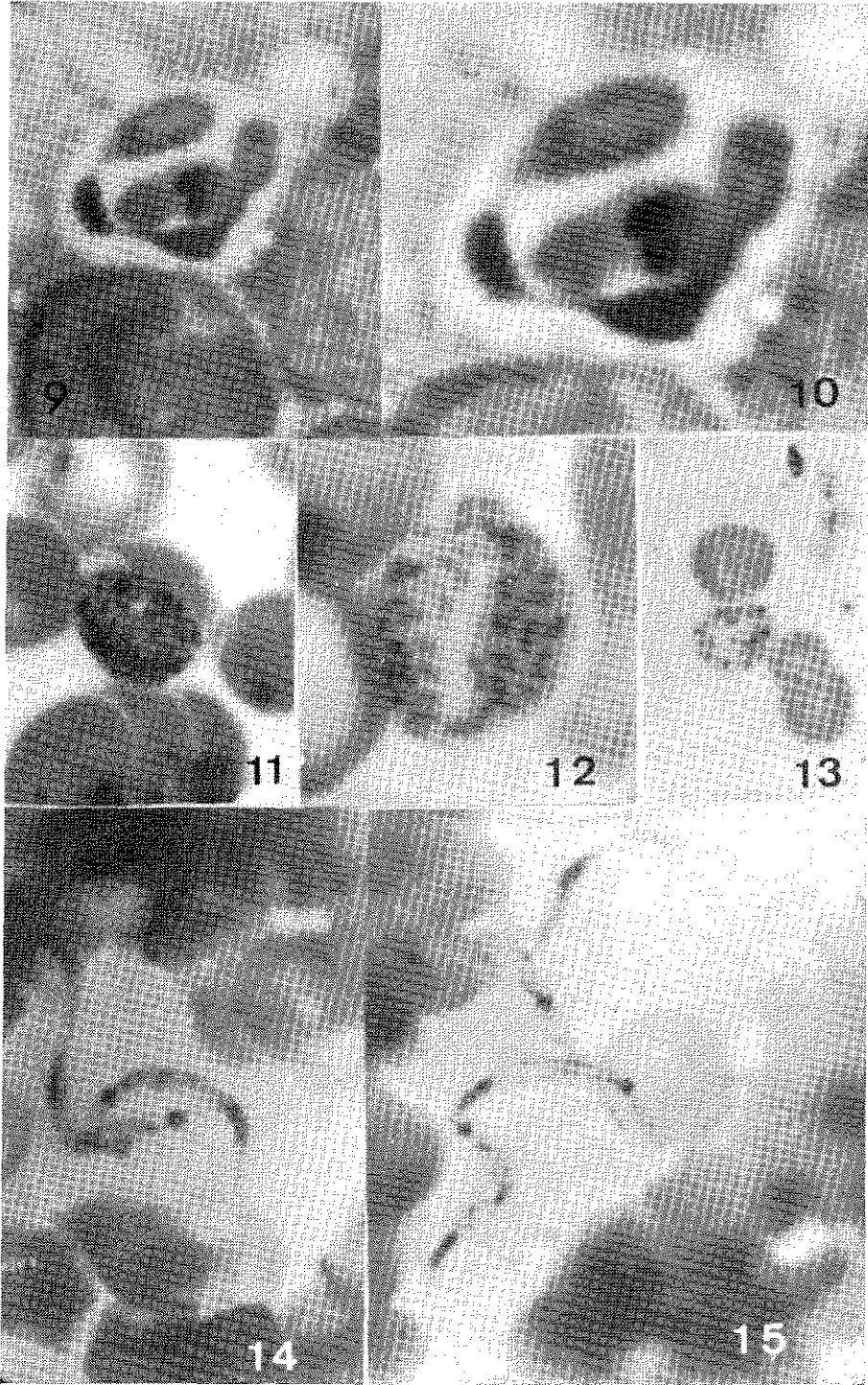
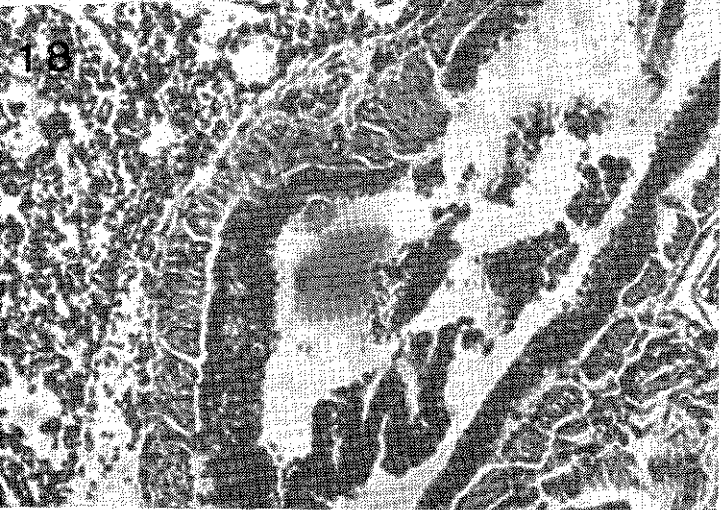
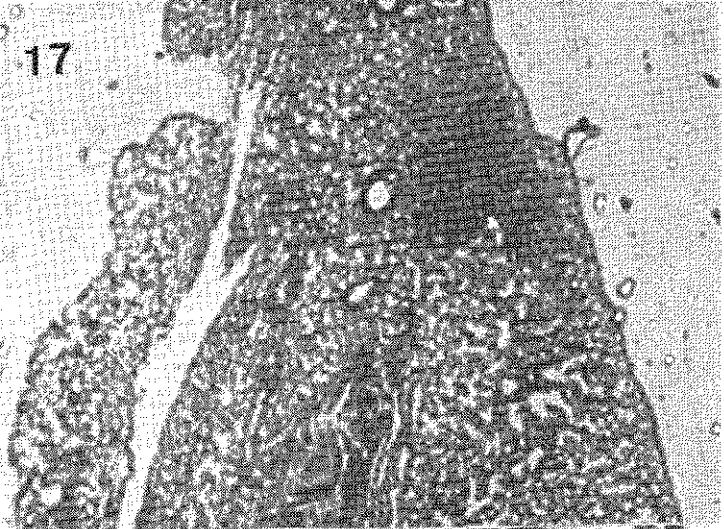
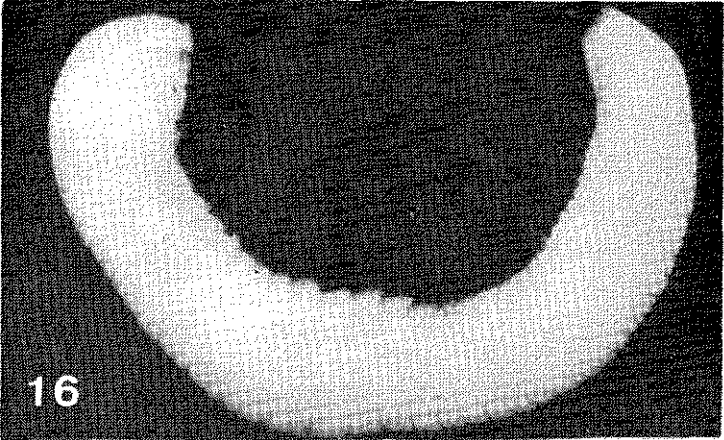


Fig. 16 — Larva do 6.º estágio de *Porocephalus crotali*, do pulmão do rato silvestre *Akodon (Thaptomys) nigrita*. Aumento cerca de 100 X.

Fig. 17 — Corte do pulmão do *Akodon (Thaptomys) nigrita* que não se mostra muito lesado; pode-se notar uma pequena área hemorrágica no ápice do pulmão.

Fig. 18 — O mesmo corte com aumento maior.



AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Ronald H. Pine do Mammalian Identification Service do Museu de Washington, pela identificação dos roedores; alguns não foram identificados até espécie, pelo fato de pertencerem, aparentemente, a espécies ainda não assinaladas em São Paulo.

Agradecemos aos biólogos do Instituto Adolfo Lutz, Dra. Gilda C. Fleury e Dra. Rosa M. de Souza Dias, pelo auxílio científico prestado e ao Dr. Jesus Carlos Machado, da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan, pelos cortes histológicos efetuados.

RIAL-A/403

PESSOA, S.B. — Notes on some parasites found in wild rats from São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 82-93, 1974.

SUMMARY: The finding of the following rats parasites in specimens from the São Paulo area, Brazil, is described in this paper:

1. *Entamoeba histolytica* was found in three specimens of *Oryzomys* sp. to which it caused lesions in the large bowel.
2. *Hepatozoon* sp. was found in a bone marrow slide, also pertaining to an *Oryzomys* specimen.
3. *Haemobartonella muris* was found in the blood of several species pertaining to genera *Oryzomys*, *Nectomys* and *Clyomys*. In the blood of a *Nectomys squamipes*, another parasite namely *Eperithroozoon* sp. was also found.
4. *Trypanosoma renjifo* Deane, 1961 was found in the blood of a *Proechmys iheringi*.
5. A 6th instar *Porocephalus crotali* larva was found in the lung of an *Akodon (Thaptomys) nigrita*.

DESCRIPTORS: parasites in wild rats; wild rats (São Paulo); *Akodon (Thaptomys) nigrita*; *Clyomys* sp.; *Nectomys* sp.; *Nectomys squamipes*; *Oryzomys* sp.; *Proechmys iheringi*; *Entamoeba histolytica*; *Eperithroozoon* sp.; *Haemobartonella muris*; *Hepatozoon* sp.; *Porocephalus crotali*; *Trypanosoma renjifo* Deane, 1961.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARINI, A. & FONSECA, F. — Grahamellas de dois murideos do Brasil. *Archos Biol. (S. Paulo)*, 25: 119-21, 1941.
2. CHIANG, S.F. — The rat as a possible carrier of the dysentery amoeba. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 6: 239-46, 1925.
3. DAVIS, J. W. & ANDERSON, R. C. — *Parasitic disease of wild animals*. Iowa, Iowa State Univ. Press., 1971. v. 1, p. 334.
4. DEANE, L.M. — Trypanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 3: 15-23, 1961.
5. DEANE, L.M. — Trypanosomídeos de mamíferos da Região Amazonica. III. Hemoscopia xenodiagnóstico de animais silvestres dos arredores de Belém, Pará. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6: 225-32, 1964.

6. ESSLINGER, J.H. — Development of *Porocephalus crotali* (Humboldt, 1808) (Pentastomida) in experimental intermediate hosts. *J. Parasit.*, 48: 452-6, 1962.
7. FAUST, E.C. — The multiple facets of *Entamoeba histolytica* infections. *Int. Rev. trop. Med.*, 1: 43-76, 1961.
8. FLYNN, R.J. — *Parasites of laboratory animal*. Iowa, Iowa State Press, 1973. p. 884.
9. GRIESEMER, R.A. — Bartonellosis. *J. natn. Cancer Inst.*, 20 (5): 949-54, 1958.
10. HOARE, C.A. — *The trypanosomes of mammals*. Oxford, Blackwell, 1972. v. 1, p. 749.
11. JONES, W.R. — The experimental infection of rats with *E. histolytica*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 40: 130-40, 1946.
12. KUDO, R.R. — *Protozoology*. 5th ed. Illinois. Charles C. Thomas, 1966. v.1, p. 1174.
13. LYNCH, K.M. — The rat, a carrier of a dysenteric ameba. *J. Am. med. Ass.*, 65: 2232-4, 1915.
14. NEAL, R.A. — Virulence in *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 51: 313-19, 1957.
15. REGO, A.A. & VICENTE, J.J. — Sobre as larvas de *Porocephalus crotali* (Humboldt, 1811) (Pentastomida) em mamíferos do Brasil. *Atas Soc. Biol. (Rio de J.)*, 15 (2): 65-6, 1972.
16. RENJIFO, S. & MOIBE, C. — Contribución al estudio de trypanosomas humanos y de animales em Colombia. I. Trypanosomas humanos. *Revta. Hig. (Bogotá)*. 24 (1): 4, 1950.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1974.

PESQUISA E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM PEIXES DE ÁGUA SALGADA E DOCE DO BRASIL *

Waldomiro PREGNOLATTO **
Neusa Santesso GARRIDO **
Myriam de TOLEDO **

RIAL-A/404

PREGNOLATTO, W.; GARRIDO, N.S. & TOLEDO, M. — Pesquisa e determinação de mercúrio em peixes de água salgada e doce do Braisl. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 95-100, 1974.

RESUMO: Descreve-se método para determinação de resíduos de mercúrio em peixes. Baseia-se na destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico, ácido nítrico e catalizador à base de dióxido de titânio; extração do mercúrio em meio fortemente ácido com solução de ditizona em tetracloreto de carbono, e determinação da absorbância em espectrofotômetro, a 490 nm.

Foi determinado o mercúrio residual em 10 amostras de peixe de água doce e 109 de água salgada, sendo que continham mercúrio 4 amostras no primeiro caso e, no segundo, 27 amostras.

A totalidade das amostras positivas e 50% das amostras negativas foram controladas por espectrofotometria de absorção atômica, havendo plena concordância nos resultados.

DESCRITORES: mercúrio residual em peixes do Brasil, determinação espectrofotométrica.

I N T R O D U Ç Ã O

Dos diferentes metais que podem contaminar um alimento é o mercúrio talvez o mais perigoso.

A presença de mercúrio em alimentos pela sua toxidez é um problema que vem nos preocupando há alguns anos, principalmente depois que em 1966 constatamos o uso indevido de pesticidas mercuriais orgâ-

nicos pelos nossos agricultores, principalmente em plantações de tomate. Naquele ano foram por nós analisadas cerca de 1.500 amostras de tomate e uma centena de amostras de massa de tomate, que apresentaram um índice de contaminação de 30% para o tomate e de 50% para as massas.

Intoxicações coletivas por mercúrio têm sido verificadas em diversas partes do mundo (Japão, Africa do Norte) principalmen-

* Realizado na Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P.
** Do Instituto Adolfo Lutz.

te depois que se permitiu o uso de cloreto de metilmercúrio para desinfetar sementes, destinadas exclusivamente ao plantio. Dois fatos importantes ocorreram: primeiro, parte dessas sementes foram desviadas para o consumo humano; segundo, os agricultores usaram indiscriminadamente o pesticida, aplicando-o diretamente a legumes, verduras, cereais etc.

Notáveis exemplos de contaminação coletiva por mercúrio e danos causados foram os ocorridos em Minamata (1953-1960) e Niigata (1964-1965), cujas famílias se alimentaram durante anos com peixes contaminados com metilmercúrio. No primeiro caso, 46 pessoas morreram entre 121 afetadas e, no segundo caso, 6 entre 47 morreram, por cerca de 1970.

Esse problema não é somente brasileiro, mas sim um problema mundial. Em vista disso, a pesquisa de resíduos de mercúrio em alimentos tornou-se quase obrigatória e, em quase todas as legislações bromatológicas, foram introduzidos limites de tolerância para mercúrio em alimentos.

A Food and Drug Administration, por exemplo, estabelece tolerância zero no caso de uso intencional, mas tolera até 0,5 ppm em peixes e produtos do mar.

Na legislação italiana a tolerância para peixes é de 0,7 ppm e, na Suécia, 1 ppm. A legislação brasileira estabelece de uma maneira geral a tolerância de 0,05 ppm de mercúrio em alimentos.

Não são os alimentos os únicos responsáveis pelas intoxicações mercuriais. Na verdade, o homem está sujeito a uma constante poluição por mercúrio através de diferentes fontes, além dos alimentos, tais como: equipamentos elétricos, antissépticos mercuriais, cosméticos etc. (A pele é muito permeável a compostos de mercúrio).

Peixes contaminados por metilmercúrio eliminam muito lentamente o tóxico, pois sua meia vida é de cerca de 2 anos, enquanto que para o homem a meia vida é de 74 dias⁷.

Teores elevados de mercúrio tem sido encontrados em peixes na Suécia, Finlândia e outros países⁴.

É importante, portanto, para a Saúde Pública, um contínuo controle do mercúrio residual nos alimentos em geral, mas principalmente nos peixes, pois a maior parte dos pesticidas mercuriais é constituída por cloreto de metilmercúrio que, por ser solúvel em água, acabará, fatalmente, contaminando as águas do mar.

Métodos para determinação de mercúrio em alimentos estão fartamente descritos na literatura, sejam químicos ou físico-químicos, tais como por ativação por nêutrons⁴, absorção atômica^{5,8}. Métodos desta classe permitem determinar resíduos de mercúrio em alimentos na casa de nanogramas.

Métodos envolvendo a destruição de substância orgânica e posterior extração do mercúrio na forma de complexo com ditizona também são descritos na literatura, dentre os quais podem ser citados os trabalhos de HORDYNSKA³, GORSUCH¹, NABRZYSKI⁶, do Analytical Methods Committee⁹ e da International Union of Pure and Applied Chemistry.

O processo proposto neste trabalho envolve a destruição da matéria orgânica com a mistura ácido sulfúrico, ácido nítrico e catalizador à base de dióxido de titânio; extração do mercúrio em meio fortemente ácido com solução de ditizona em tetracloreto de carbono e leitura espectrofotométrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Espectrofotômetro *

Reagentes

Ácido sulfúrico concentrado

Ácido nítrico concentrado

Tetracloroeto de carbono

Cloridrato de hidroxilamina

Sulfato de sódio anidro

Mistura catalizadora

dióxido de titânio — sulfato de potássio (0,6:10)

Solução aquosa de ácido sulfúrico (1:1)

Solução estoque de ditizona

Transfira 50 mg de difeniltiocarbazona, exatamente pesada e previamente purificada para balão volumétrico de 1.000 ml e complete o volume com tetracloroeto de carbono. Agite até dissolução completa.

Solução de trabalho de ditizona

Transfira 20 ml solução estoque, exatamente medidos, para balão volumétrico de 100 ml, complete o volume com tetracloroeto de carbono e homogeneíze por agitação.

Nota: todos os reagentes foram testados e estão isentos de mercúrio.

Técnica

1. Preparo e análise da amostra

a) Retire os filés dos peixes, sem pele e espinhas. Homogeneíze bem. Pese 10 g, seque em estufa a 40°C, durante cerca de mais ou menos 12 horas. Transfira para balão de fundo chato de 250 ml de capacidade, com boca de esmeril, adicione 20 ml de ácido sulfúrico e 6 g da mistura catalítica.

b) Coloque um condensador (de preferência de bolas) e aqueça durante 5 minutos. Deixe esfriar (\pm 5 minutos) e adicione 2 ml de ácido nítrico. Aqueça por mais 10 minutos. Desligue. Esfrie e adicione 2 ml de ácido nítrico. Aqueça novamente por mais 10 minutos. Desligue. Esfrie e adicione mais 2 ml de ácido nítrico. Aqueça por mais 25 minutos.

Deixe esfriar bem e lave o condensador com 20 e depois com 10 ml de ácido sulfúrico (1:1) e, em seguida, com duas vezes 50 ml de água destilada.

Transfira quantitativamente o conteúdo do balão para um balão volumétrico de 250 ml e complete o volume com água.

Transfira 125 ml dessa solução para copo de 600 ml e aqueça em banho-maria, cuidadosamente, até que a solução atinja a temperatura de 40°C, adicione 2 g de cloridrato de hidroxilamina e deixe em repouso até esfriar (\pm 30 minutos).

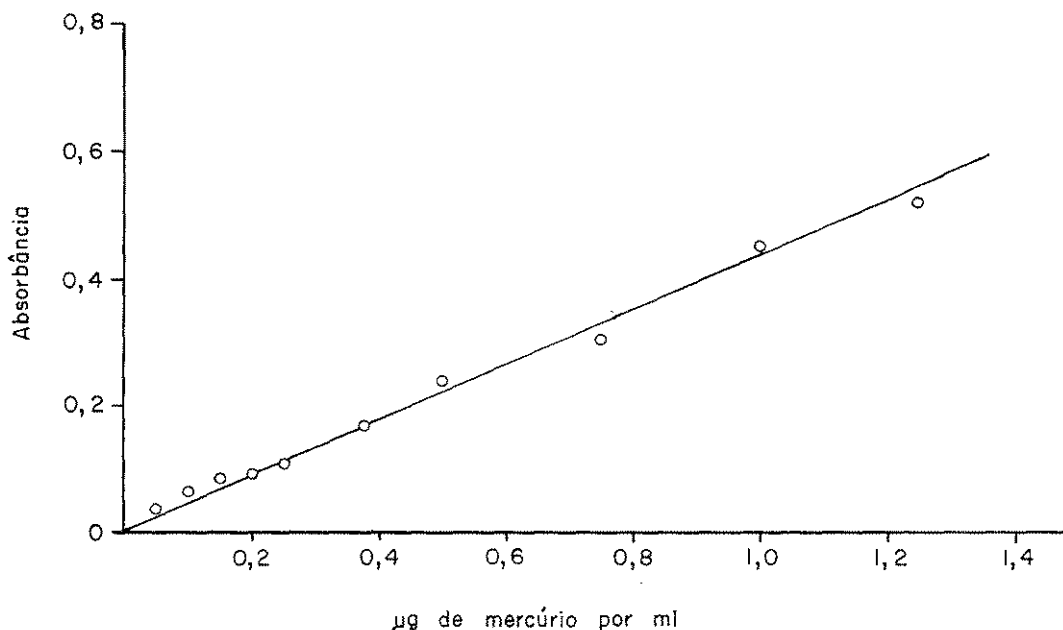
Transfira a solução fria para funil de separação de 250 ml e junte 2 ml de tetracloroeto de carbono. Agite vigorosamente por mais ou menos 30 segundos. Deixe separar as camadas e despreze a de tetracloroeto de carbono. Extraia então o mercúrio com duas vezes 5 ml de solução de trabalho de ditizona, reunindo os extratos em tubo de ensaio.

Filtre através de papel contendo 2 g de sulfato de sódio anidro e determine a absorvância a 490 nm, usando como branco a solução de ditizona de trabalho tratada como se indica a seguir:

Branco — A 10 ml de ditizona de trabalho adicione 2 g de cloridrato de hidroxilamina, agite e filtre através de papel contendo 2 g de sulfato de sódio anidro.

Calcule a quantidade de mercúrio comparando a leitura em curva padrão pré-estabelecida:

* Beckman DU.



Curva padrão para determinação colorimétrica do mercúrio.
(Espectrofotômetro Beckman DU, 490 nm, cuba de 1 cm)

2. Curva padrão

Transfira para balão de fundo chato de 250 ml de capacidade, com boca de esmeril, 20 ml de ácido sulfúrico, 6 g da mistura catalítica, quantidades apropriadas de solução padrão de mercúrio contendo de 1,0 a 25,0 µg de mercúrio e continue a partir do item b .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método é simples, rápido, demanda pouca aparelhagem e pode ser realizado em laboratórios com equipamentos modestos. A sensibilidade vai até 0,2 µg de mercúrio por ml.

Com esse método foram analisadas 109 amostras de produtos do mar e 10 amostras de peixe de água doce; eram de sardinha, pargo, serra, merluza, garoupa, namorado, linguado, peixe espada, bonito, tainha, lula, pescada, camarão, mariscos, man-

juba, porquinho, cação, curimatá, mandigauá, lambari, traíra e tilápia.

Das espécies de água salgada analisadas, em 82 amostras não foi positivada a presença de mercúrio e, em 27, foram encontrados de 0,01 a 0,66 ppm de mercúrio, com um valor médio de 0,25 ppm. A maioria dos peixes contaminados eram pargos provindos do Rio Grande do Sul. Os peixes do litoral Paulista, com exceção de algumas amostras entre sardinhas, manjubas, porquinhos, pescadas e cação, mostraram-se quase sempre limpos.

Dos peixes de água doce, 40% das amostras apresentaram-se positivas e 60%, negativas. Esses resultados foram confirmados por espectrofotometria de absorção atômica, segundo HATCH & OTT², havendo plena concordância de resultados. Note-se que, por absorção atômica, positiva-se até 1 ng de mercúrio.

Detalhamos na tabela seguinte as espécies de peixe analisadas e os resultados, onde algumas amostras de mariscos e crustáceos foram também incluídas:

Quantidades e tipos de peixes analisados

Produtos do mar	Procedência	Amostras		
		Analisadas	Positivas	Negativas
		n. ^o	n. ^o	n. ^o
Pargo	R. G. do Sul (S)	42	20	22
Pargo	Lit. Paulista (S)	3	—	3
Sardinha	Lit. Paulista (S)	13	3	10
Manjuba	Lit. Paulista (S)	1	1	—
Porquinho	Lit. Paulista (S)	1	1	—
Pescada	Lit. Paulista (S)	14	1	13
Cação	Lit. Paulista (S)	1	1	—
Serra	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Merluza	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Garoupa	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Namorado	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Linguado	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Espada	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Bonito	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Tainha	Lit. Paulista (S)	4	—	4
Lula	Lit. Paulista (S)	1	—	1
Camarão	Lit. Paulista (S)	15	—	15
Marisco	Lit. Paulista (S)	7	—	7
Curimatá	Ibitinga-S.P. (D)	1	1	—
Mandi-Guaçú	Ibitinga-S.P. (D)	1	1	—
Traíra	São Paulo (D)	2	1	1
Lambari	São Paulo			
	Represa (D)	1	1	—
Tilápia	São Paulo			
	Represa (D)	5	—	5

S = peixes de água salgada

D = peixes de água doce

Dos resultados obtidos podemos concluir que os peixes do litoral paulista estão relativamente limpos em relação ao mercúrio, não havendo perigo imediato no seu consumo, enquanto que uma pesquisa

mais detalhada e com outros tipos de peixes do Sul deve ser feita para se verificar se a contaminação encontrada foi acidental ou se de fato a poluição é geral.

RIAL-A/404

PREGNOLATTO, W.; GARRIDO, N.S. & TOLEDO, M. — Research and detection of mercury residues in Brazilian salt and fresh water fishes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 95-100, 1974.

SUMMARY: A method for detecting mercury residues, specially in fish, is described herein. The method is based on the destruction of the organic material with sulfuric and nitric acids, being this operation catalysed by titanium dioxide, extraction of mercury by a solution of ditzone in carbon tetrachloride in heavy acid medium, and verification of the absorbance rate at 490 nm in a spectrophotometer.

10 samples of fresh water fishes and 109 of salt water fishes were analysed and as a result it was detected the presence of mercury in 4 of the former and 27 of the latter.

All positive samples and 50% of the negative ones were also analysed through atomic absorption spectrophotometry, and a complete consonance was observed in the results.

DESCRIPTORS: mercury residues in fish (Brazil), spectrophotometric determination.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GORSUCH, T.T. — Radiochemical investigation on the recovery for analysis of trace elements in organic and biological materials. *Analyst* (London), 84: 135-72, 1959.
2. HATCH, W.R. & OTT, W.L. — Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analyt. Chem.*, 40: 2085-7, 1968.
3. HORDYNSKA, S.; LEGATOWA, B.; KOBYLECKA, K.; ROSYCKA, D. & STRYCHARSKA, M. — Oznaczenie mikrogramowych ilości rtęci w ryżu (Determination of microgram amounts of mercury in rice). *Roczn. panst. Zakł. Hig.*, 20: 391-402, 1969.
4. ISHIDA, K.; KAWAMURA, S. & IZAWA M. — Neutron activation analysis for mercury. *Analytica chim. Acta*, 50: 351-3, 1970.
5. LINDSTEDT, G. apud SHARE, I.⁸
6. NABRZYSKI, M. — Improvements in the wet oxidation-dithizone method for determining low mercury levels in food. *Analyt. Chem.*, 45: 2438-40, 1973.
7. SECRETARY'S PESTICIDE ADVISORY COMMITTEE, DHEW, Study Group of Mercury Hazards apud KRAKBILL, H.F. & REYNOLDS, H.L. — Problems of mercury contamination. *FDA. By-lynes*, 6: 271-89, 1972.
8. SKARE, I. — Microdetermination of mercury in biological samples. III. Automated determination of mercury in urine, fish and blood samples. *Analyst*, 97: 148-55, 1972.
9. SOCIETY FOR ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, Analytical Methods Committee, Metallic Impurities in Organic Matter Sub-Committee — The determination of small amounts of mercury in organic matter. *Analyst*, 90: 515-30, 1965.

Recebido para publicação em 16 de agosto de 1974.

ISOLAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO *

Chifumi TAKEUCHI **
Gil Vital Álvares PESSÔA **
Ernesto HOFER ***
Carmo Elias Andrade MELLES **
Mathilde RASKIN **

RIAL-A/405

TAKEUCHI, C.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. &
RASKIN, M. — Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido
cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 101-107, 1974.

RESUMO: Foi realizada pesquisa sistemática em 1 008 amostras de líquidos cefalorraquidianos, turvos e purulentos, no período de novembro de 1973 a junho de 1974, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, que demonstraram ausência de outros microrganismos, no intuito de esclarecer a participação de *Listeria monocytogenes*. Todas as amostras foram incubadas nas temperaturas de 4 e 15°C, tendo sido isolada esta bactéria em 4 amostras; em uma delas, apenas a 4°C, em duas, apenas a 15°C e, em uma, em ambas as temperaturas. A quase totalidade, foi isolada após uma semana de incubação a baixa temperatura.

Três amostras pertenciam ao sorotipo L 1/2a e uma ao L 4/b.

DESCRITORES: meningite por *Listeria*; *Listeria monocytogenes*;
líquido cefalorraquidiano, isolamento de *Listeria monocytogenes*.

I N T R O D U Ç Ã O

A despeito das inúmeras descrições revelando o crescente aumento da freqüência do encontro de *Listeria monocytogenes* na natureza ^{3, 17}, ainda assim, o seu isolamento de espécimes clínicos, contaminados

ou não, apresenta sérias dificuldades devidas principalmente à peculiaridade inerente ao seu primo isolamento.

Contornada essa situação, o microrganismo desenvolve-se com extrema facilidade nos meios artificiais comumente empregados, à temperatura de 37°C.

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P., e no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, GB.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz.

A técnica de crio-enriquecimento em temperaturas de 4°C é considerada de fundamental importância no isolamento dessa bactéria, segundo vários autores^{1,3,4,5,8,10,11,13,17}, embora DESPIERRES⁴ tenha utilizado e preconizado a temperatura de 15°C, como ideal para o enriquecimento de *Listeria*, em material altamente contaminado.

Com o intuito de esclarecer a participação deste microrganismo na etiologia das meningites purulentas, foi realizada na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, durante o período de novembro de 1973 a junho de 1974, uma pesquisa sistemática em líquidos cefalorraquidianos (L.C.R.) oriundos de doentes internados no Hospital Emílio Ribas, São Paulo, nos quais os resultados demonstraram ausência de outros agentes bacterianos, normalmente detectados pelo esquema rotineiro adotado por esta Seção.

Considerando a importância do crio-enriquecimento para o cultivo inicial de *L. monocytogenes*, foi ainda efetivada, no transcurso deste levantamento, uma análise confrontando o comportamento das temperaturas de 4°C e 15°C, durante a fase do isolamento primário.

MATERIAL E MÉTODO

Foram examinadas 1.008 amostras de L.C.R., caracteristicamente turvos ou purulentos, provenientes de doentes internados

no Hospital Emílio Ribas. A totalidade deste material não evidenciou crescimento microbiano nos meios de cultura, utilizados na rotina, para demonstrar a presença de outras bactérias.

Alíquotas de 0,5 ml de L.C.R. foram semeadas em duplicata, em tubos contendo 10 ml de caldo triptose*, com 0,5% de dextrose, sendo uma das amostras incubada a 4°C e outra a 15°C, durante cinco semanas. Dos meios semeados, foram retirados repiques semanalmente e transferidos para placas de ágar triptose* e incubados a 37°C, por 48 horas.

Para o reconhecimento e isolamento das colônias lançou-se mão da técnica de GRAY⁷, sendo a seguir analisadas sob o ponto de vista morfo-tintorial e bioquímico.

Nas linhagens que se comportaram como *Listeria monocytogenes*, fez-se a caracterização sorológica, de acordo com o processo descrito por DONKER-VOET⁵, aliada à execução da prova de Anton, que evidencia a ação patogênica experimental desta bactéria.

RESULTADOS

Das 1.008 amostras de L.C.R. estudadas foram isoladas e identificadas 4 cepas de *Listeria monocytogenes*, que apresentaram os seguintes caracteres morfológicos, culturais, bioquímicos e poder patogênico experimental, sumariados na tabela 1:

* Tryptose Broth Difco.

** Tryptose ágar Difco.

TABELA 1

Caracteres morfológico, cultural, bioquímico e patogenicidade experimental das 4 cepas de Listeria monocytogenes isoladas

Gram	positiva
Flagelação (campo escuro)	peritriquia
Metabolismo respiratório	aeróbio, anaeróbio facultativo
Crescimento em ágar nutriente	colônias pequenas com bordos lisos
Hemólise em ágar sangue de carneiro	total (beta)
Motilidade a 37°C	negativa
a 22°C	positiva
Catalase	+
Oxidase	-
Nitrato redutase	-
Urease	--
H ₂ S	--
Arabinose	-
Dextrina	+
Esculina	+
Glicose	+ (sem gás)
Lactose	+ (1)
ONPG	+
Levulose	+
Maltose	+
Manitol	-
Ramnose	+ (2)
Sacarose	+ (3)
Salicina	+
Trealose	+
Prova de Anton	positiva

+ = ácido após 1 dia.

- = negativo após 30 dias.

(1) = 2 amostras positivas em 5 dias, 2 amostras positivas em 10 dias.

(2) = 1 amostra positiva em 3 dias.

(3) = 1 amostra positiva em 3 dias, 3 amostras positivas em 10 dias.

A identificação sorológica efetuada revelou a presença de dois sorotipos distintos (tabela 2):

As amostras identificadas nesta etapa de trabalho, como prováveis pertencentes

ao sorotipo L 1/2a (culturas números 121, 199 e 352), foram, em fase subsequente, analisadas diante dos anti-soros OH dos tipos L 1/2a e L 1/2b. Os resultados, obtidos na titulação dos antígenos flagelares,

TABELA 2

Caracterização sorológica das amostras isoladas de Listeria monocytogenes

Antígenos somáticos	Antígenos somáticos			
	L 1/2a	L 1/b	L 4a	L 4b
L 1/2a	1/640	1/320	—	—
L 1/2b	1/320	1/1 280	1/20	1/20
L 4a	1/20	1/20	1/1 280	1/160
L 4b	1/40	1/20	1/80	1/1 280
121	1/640	1/160	1/20	1/20
199	1/640	1/320	—	1/20
352	1/640	1/320	1/40	1/20
826	—	—	1/80	1/1 280

TABELA 3

Distribuição dos sorotipos isolados segundo a idade e o sexo

Número das amostras	Sorotipos	Idade (anos)	Sexo
121	L 1/2a	57	Fem.
199	L 1/2a	1	Fem.
352	L 1/2a	39	Masc.
826	L 4b	12	Fem.

demonstraram que as cepas em questão enquadram-se com uniformidade no sorotipo L 1/2a.

Com referência a outros aspectos implicados com o isolamento dos diferentes

sorotipos de *Listeria monocytogenes*, cumpre ainda destacar os dados referentes à idade e sexo dos portadores (tabela 3), assim como os períodos em que foram detectados após o enriquecimento nas duas temperaturas empregadas (tabela 4):

TABELA 4

Freqüência dos isolamentos das amostras nos diferentes períodos de crio-enriquecimento e nas temperaturas empregadas

Número das amostras	Soro-tipos	Presença de crescimento em semanas					Temperaturas	
		1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	4°C	15°C
121	L 1/2a	+	+	+	+	+	+	-
199	L 1/2a	+	+	-	-	+	-	+
352	L 1/2a	+	+	-	-	+	-	+
826	L 4b	-	+	+	+	-	+	+

+ = positiva
- = negativa

DISCUSSÃO

As manifestações clínicas da listeriose humana são extremamete variáveis, observando-se, no entanto, predominância de localização no sistema nervoso central e, neste, comprometimento preferencial das meninges, de acordo com BUSCH³ e SEELIGER¹⁵.

A *Listeria monocytogenes* pode advir como agente secundário de diversas afecções de natureza crônica, como soe acontecer no transcurso da Doença de Hodgkin, de outras neoplasias, no diabetes mélico e no lupus eritematoso. Por vezes, esta situação está intimamente relacionada com o emprego de certos esquemas terapêuticos, em que se faz uso de corticóides e de fármaco-imuno-depressores (GRABER et alii⁶, BUCHNER & SCHNEIERSON² e JOHNSON & COLLEY¹²).

Um exemplo bem típico do problema questionado refere-se ao achado de SUASSUNA et alii¹⁶, que isolaram uma amostra de *Listeria monocytogenes*, caracterizada como sorotipo L 1, de um caso de meningite em paciente adulto e cujo diagnóstico primário foi firmado como sendo linfoma.

Nos quatro casos em que foi isolada *Listeria*, o quadro clínico era o de meningite purulenta aguda, não tendo em nenhum deles ocorrido a administração de drogas imunodepressoras; todos os pacientes alcançaram a cura clínica.

Embora seja restrito o número de nossas observações, é interessante assinalar que as amostras 352 e 826 foram isoladas de pacientes pertencentes às faixas etárias em que raramente é assinalada a presença de *Listeria* como causa de meningite ou meningoencefalite (BOJSEN-MÖLLER¹).

Outro aspecto a ser detalhado é o da importância do crio-enriquecimento como técnica prioritária para o isolamento dessa bactéria, considerando que, na maioria das vezes, a incubação do material a 37°C é satisfatória para o seu pleno desenvolvimento. Sem dúvida alguma, esta condição cria sérios problemas para a adoção mais imediata das medidas terapêuticas, tendo em vista a demora do diagnóstico bacteriológico; todavia, nenhum outro recurso laboratorial foi idealizado para contornar este óbice, até o momento.

Verifica-se, pelos resultados expostos na tabela 4, na incubação do material a baixa temperatura, que a quase totalidade das amostras de *Listeria* foi isolada após uma semana de permanência e, curiosamente, todas as amostras pertenciam ao sorotipo L 1/2; cumpre também salientar que a temperatura de 15°C evidenciou uma pequena superioridade sobre a de 4°C, no que tange ao crescimento das amostras isoladas. Este aspecto, por sinal, é dos mais controvertidos, tendo em vista as diferentes opiniões emitidas, nas quais se encontram referências à temperatura ideal para *Listeria*

monocytogenes, situada a 4°C, segundo GRAY & KILINGER⁸, GRAY & STAFSET⁹ e BOJSEN-MÖLLER¹; 10°C, segundo WILKINS et alii¹⁸; 15°C, segundo DESPIERRES⁴; 30°C, segundo KRAMER & JONES¹⁴.

CONCLUSÕES

Pela primeira vez em São Paulo foi conseguido o isolamento e a identificação

de *Listeria monocytogenes* entre 1 008 L.C.R. turvos ou purulentos, provenientes do Hospital Emílio Ribas. Dos quatro casos, três pertenciam ao sorotipo L 1/2a e um ao L 4b.

Todos os pacientes apresentaram um quadro clínico agudo de meningite purulenta, tendo alcançado a cura.

Se bem que a casuística seja pequena, o melhor resultado por nós obtido foi com enriquecimento à temperatura de 15°C.

RIAL-A/405

TAKEUCHI, C.; PESSOA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M. — Isolation of *Listeria monocytogenes* from cerebrospinal fluid. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 101-107, 1974.

SUMMARY: From November 1973 to June 1974 a systematic research on 1 008 samples of feculent and purulent cerebral spinal fluid was carried out at the Instituto Adolfo Lutz. Such study was developed to disclose the extension of the role of *Listeria Monocytogenes* in this type of infection. As a general result it was demonstrated that no other micro-organisms took part in the process. All samples were incubated from 4 samples only. In one of these samples isolation was made at 4°C; in two other samples at 15°C and in the 4th sample isolation was obtained at both temperatures.

In almost all cases bacteria was isolated after one week incubation period under low temperature.

DESCRITORES: meningitis, *Listeria*; *Listeria monocytogenes*; cerebrospinal fluid, isolation of *Listeria monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOJSEN-MÖLLER, J. — Human Listeriosis: diagnostic, epidemiological and clinic studies. *Acta path microbiol. scand.*, Section B (Suppl.), 229: 1-157, 1972.
2. BUCHNER, L.H. & SCHNEIERSON, S.S. — Clinical and laboratory aspects of *Listeria monocytogenes* infections, with a report of ten cases. *Am. J. Med.*, 45: 904-21, 1968.
3. BUCH, A.L. — Human Listeriosis in the United States, 1967-1969. *J. infect. Dis.*, 123: 328-32, 1971.
4. DESPIERRES, M. — Isolement de *Listeria monocytogenes* dans un milieu défavorable a *Streptococcus faecalis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 121: 493-501, 1971.
5. DONKER-VOET, J. — A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. vet. Res.*, 20: 176-9, 1959.
6. GRABER, C.D.; HIGGINS, L.S. & DAVIS, J.S. — Seldom-encountered agents of bacterial meningitis. *J. Am. med. Ass.*, 192: 956-60, 1965.

TAKEUCHI, C.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M. — Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 101-107, 1974.

7. GRAY, M.L. — A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. I, Orig.*, **169**: 373-77, 1957.
8. GRAY, M.I. & KILLINGER, H.A. — *Listeria monocytogenes* and Listeric infection. *Bact. Rev.*, **30**: 309-82, 1966.
9. GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J., THORP JR., F.; SHOLL, L.B. & RILEY JR., W.P. — A new technique for isolating *Listerellae* from bovine brain. *J. Bact.*, **55**: 471-6, 1948.
10. HOFER, E. — Presença de *Listeria monocytogenes* em material encefálico do bovino. *Arq. Inst. Biol. (S. Paulo)*, **38**: 285-7, 1971.
11. HOFER, E. — Studies on a strain of *Listeria (L. grayi)* isolated from bovine nasal secretion. *Rev. Microbiol.*, **3**: 101-2, 1972.
12. JOHNSON, M.L. & COLLEY, E.W. — *Listeria monocytogenes* encephalitis associated with corticosteroid therapy. *J. clin. Path.*, **22**: 465-9, 1969.
13. KAMPELMACHER, E.H. & JANSEN, M.V. M. — Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. I, Orig, Ser. A*, **221**: 70-77, 1972.
14. KRAMER, P.A. & JONES, D. — Media selective for *Listeria monocytogenes*. *J. appl. Bact.*, **32**: 381-94, 1969.
15. SEELIGER, H.P.R. — *Listeriosis*. New York, Hafner, 1961. 308 p.
16. SUASSUNA, I.; SANTOS, L.C.; SUASSUNA, I.R. & PINHEIRO, J. — Listeriose do Sistema Nervoso no Estado da Guanabara. *Anais Microbiol.*, **16**: 161, 1969.
17. WELSHIMER, H.J. & DONKER-VOET, J. — *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.*, **21**: 516-9, 1971.
18. WILKINS, P.O.; BOURGEOIS, R. & MURRAY, R.G.E. — Psychotropic properties of *Listeria monocytogenes*. *Can. J. Microbiol.*, **18**: 543-51, 1971.

Recebido para publicação em 18 de setembro de 1974.

PNEUMOPATIA POR *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Apresentação de um caso clínico com a respectiva
comprovação etiológica *

Sueko TAKIMOTO ***
Cláudio Sérgio PANNUTI **
Guido Carlos LEVI **
Vicente AMATO NETO **
Heloisa Helena BARBOSA ***
Hatune TANAKA ***
Luís Florêncio de SALLES-GOMES ***

RIAL-A/406

TAKIMOTO, S.; PANNUTI, C.S.; LEVI, G.C.; AMATO NETO, V.;
BARBOSA, H.H.; TANAKA, H. & SALLES-GOMES, L.F. — Pneumopatia por *Mycoplasma pneumoniae*: apresentação de um caso clínico com a respectiva comprovação etiológica. *Rev. Adolfo Lutz*, 34: 109-117, 1974.

RESUMO: *Mycoplasma pneumoniae* foi isolado e identificado a partir de material da orofaringe de uma criança de 13 anos de idade que apresentava, ao estudo radiográfico, aspecto de broncopneumonia no lobo inferior esquerdo.

Os exames sorológicos demonstraram aumento significativo de anticorpos contra o *M. pneumoniae* no soro colhido durante a convalescença da infecção.

Não foi evidenciada qualquer alteração de títulos de anticorpos contra A/England/42/72, A/Hong Kong/1/68, B/Massachusetts/66, adenovírus e vírus respiratório sincicial.

O quadro clínico e a resposta do paciente ao tratamento com a eritromicina não diferiram dos de casos similares relatados na literatura.

DESCRITORES: broncopneumonia; *Mycoplasma pneumoniae*.

I N T R O D U Ç Ã O

Em 1944, EATON et alii⁹ descreveram o isolamento de um agente filtrável de casos clínicos de pneumonia primária atípica.

Posteriormente, estudos em voluntários humanos demonstraram a possibilidade de transmissão desta infecção pelo agente isolado, o qual ficou conhecido como agente de Eaton²². Em 1962, CHANOCK et alii^{6,7}

* Realizado no Serviço de Doenças Transmissíveis do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", São Paulo, S.P. e na Seção de Vírus Respiratórios Entéricos e Outros do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P.

** Do Hospital do Servidor Público Estadual.

*** Do Instituto Adolfo Lutz.

caracterizaram o agente de Eaton como uma micobactéria pertencente à família das *Mycoplasmataceae* e propuseram o nome de *Mycoplasma pneumoniae*⁵.

A importância deste agente como causador de doença respiratória aguda no homem foi demonstrada através de numerosas investigações epidemiológicas e estudos em voluntários^{1,2,3,5,11,12,14,15,16,25}. Verificou-se que a infecção humana por *Mycoplasma pneumoniae* pode ser a causadora de um espectro variável de respostas clínicas, desde as chamadas infecções sub-clínicas até a pneumonia primária atípica grave.

A frequência da pneumonia primária atípica em relação às pneumonias de outras etiologias é variável, segundo alguns autores, dependendo da população estudada. MUFSON *et alii*¹⁴ estimaram a frequência em 4% das pneumonias verificadas em hospitais. Já MOGABGAB²³ encontrou índice de 45% em recrutas, e EVANS *et alii*¹⁰ cita que em universitários do Estado de Wisconsin a frequência da pneumonia primária atípica devida ao *M. pneumoniae* é de 40% do total das pneumonias observadas. Em populações abertas, a frequência achada foi de 20% em crianças na idade escolar e em adultos jovens, sendo que a frequência máxima da infecção ocorreu no grupo etário de 5-10 anos.

O presente trabalho relata, pela primeira vez em nosso meio, um caso clínico de pneumonia primária atípica confirmado etiológicamente pelo isolamento e identificação do *Mycoplasma pneumoniae* e pela resposta sorológica específica. Tem, ainda, o propósito de chamar a atenção para o diagnóstico desta infecção que por vezes pode ser grave, e alertar para a possibilidade prática da sua confirmação laboratorial.

ESTUDO CLÍNICO

Apresentação do caso

F.L.C., paciente de treze anos, procedente de São Paulo, S.P., apresentou em 16/08/1973 mal-estar geral, cefaléia e febre

contínua, variando de 38 a 39°C. Um dia após, teve início tosse seca irritativa, sendo prontamente medicado com Pivampicilina, na dose de 2 g por dia, via oral. No quinto dia da doença, com os mesmos sintomas, foi feita radiografia do tórax, cuja chapa demonstrou somente "hilos alargados". Foi acrescentada ao esquema terapêutico Gentamicina, na dose de 40 mg, intramuscular, cada doze horas. No oitavo dia da evolução da doença, foi atendido no Serviço de Doenças Transmissíveis do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", em São Paulo. Nessa ocasião, queixou-se de cefaléia, tosse seca e febre diária que variava de 37,5 a 37,7°C. No interrogatório complementar, negou coriza, otalgia, dor de garganta, náuseas e vômitos. Os antecedentes pessoais e epidemiológicos não revelaram quaisquer dados de interesse.

Ao exame físico, o paciente apresentava bom estado geral: eupnéico, acianótico, hidratado e corado. A temperatura axilar estava em 39°C e a tensão arterial foi de 12 X 6, o pulso estava com 100 batimentos por minuto, cheio e rítmico. Não apresentava lesões cutâneas; foram encontrados alguns linfonodos cervicais posteriores de cerca de 0,5 cm de diâmetro, discretamente dolorosos. O cavum não mostrava alterações dignas de nota, assim como o restante do exame físico, com exceção do exame do tórax que apresentava, à ausculta, estertores crepitantes na base pulmonar esquerda e alguns roncos esparsos. Foi submetido a novo exame pelos raios X e as chapas resultantes foram interpretadas como de processo broncopneumônico no segmento posterior do lobo inferior esquerdo (fig. 1). Exames complementares feitos na ocasião resultaram no seguinte:

Hemograma: série vermelha e plaquetínea, normais. Global de leucócitos, 14.600, com 1% de bastonetes, 62% de segmentados, 10% de eosinófilos, 19% de linfócitos, 7% de monócitos e 1% de plasmócitos. O teste do N.B.T. (nitroblue-tetrazolium) foi de 6%; mucoproteínas, 2,6 g%; Paul-Bunnell, Davidsohn e Sabin-Feldman, negativas.

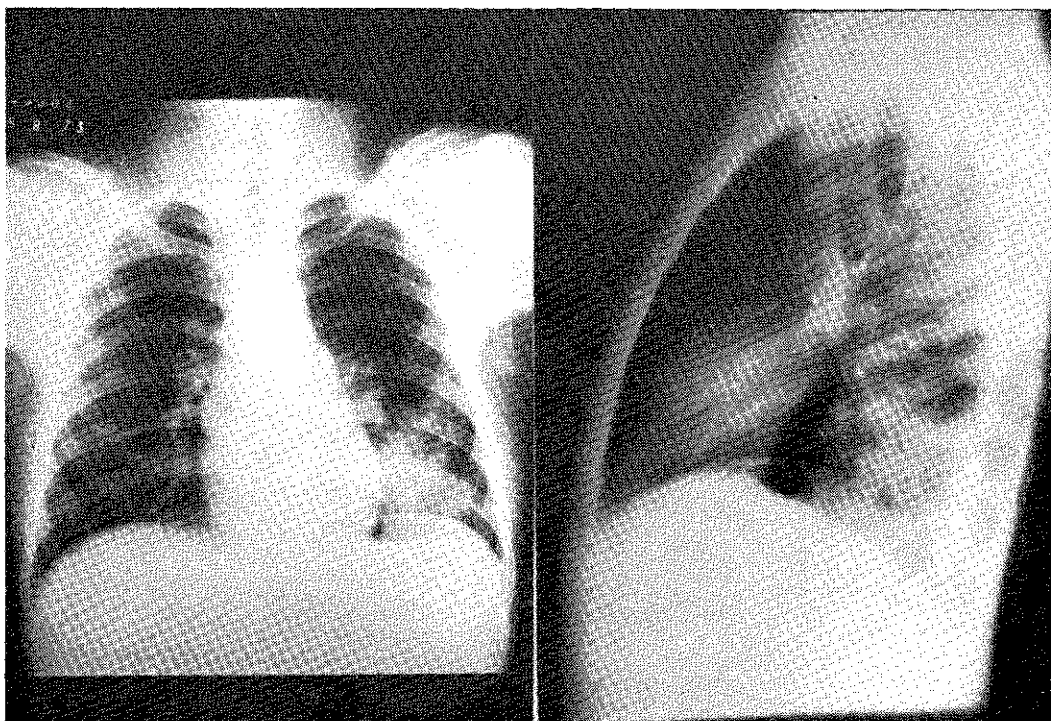


Fig. 1 — Radiografias mostrando opacificação heterogênea no lobo inferior do pulmão esquerdo.

Foi adicionada Cefalexina na dose de 3 g por dia, via oral, ao esquema de tratamento. Como após dois dias ainda persistissem febre e tosse, com propedêutica pulmonar inalterada, foi internado para tratamento intensivo.

O tratamento por antibióticos, foi mudado para Penicilina G cristalina na dose de 3 milhões de unidades a cada quatro horas, por via endovenosa, Cefalotina na dose de 1 g a cada seis horas, por via endovenosa, Oxacilina na dose de 1 g a cada seis horas, por via endovenosa e Gentamicina na dose de 60 mg a cada oito horas, por via intramuscular. Nesta ocasião, novas radiografias demonstraram o mesmo aspecto das anteriores.

Devido à evolução clínica da infecção e ao quadro radiográfico, aventou-se a possibilidade de tratar-se de uma pneumonia pri-

mária atípica. Conseqüentemente, orientouse a investigação laboratorial no sentido de esclarecer a etiologia e foi solicitada a dosagem de crioaglutininas, tentando-se o cultivo e sorologia específica para *M. pneumoniae*.

Várias hemoculturas foram realizadas e todas resultaram negativas para bactérias.

Em vista do resultado da titulação das crioaglutininas (1:256), a hipótese diagnóstica de pneumonia primária atípica tornou-se mais consistente.

Em 30/08/1973, portanto com duas semanas de doença, o quadro clínico do paciente permanecia inalterado. Com o resultado das crioaglutininas, foi abandonado o esquema terapêutico até então usado e substituíram-se todos os antibióticos por somente Eritromicina na dose de 2 g por dia, via oral e Gentamicina na mesma dose

usada anteriormente. A melhoria da sintomatologia foi evidente e, após 24 horas, a febre do paciente não ultrapassou 37,2°C. Teve alta quatro dias após, em boas condições, afebril, porém com tosse seca discreta e estertores crepitantes na base pulmonar esquerda. Ainda estavam presentes alguns roncós e síbilos esparsos.

A administração de Gentamicina foi suspensa três dias após a alta e a Eritromicina foi mantida até o décimo dia após a alta.

No dia 10/09/1973 o paciente foi examinado novamente, estando completamente assintomático e com propedêutica pulmonar normal.

ESTUDO ETIOLÓGICO

Materiais e Métodos

Foi colhido, por meio de bastão de "swab", material da orofaringe para a tentativa de isolamento de vírus e micoplasma. Duas amostras de sangue foram colhidas, a 1.ª, no 4.º dia de evolução da doença e a 2.ª, exatamente 17 dias após a 1.ª colheita. O material da orofaringe foi suspenso em caldo glicosado e guardado em congelador a -70°C até o momento em que foi inoculado em meio de cultura adequado para o isolamento de vírus respiratórios e micoplasmas. Para o isolamento de vírus respiratórios foram utilizados sistemas celulares denominados Hep-2 e Vero (linhagens contínuas de células humanas e de macaco) mantidas em nosso laboratório, e ovos embrionados de galinha. A manutenção das culturas celulares, observação do efeito citopático e as reações de hemaglutinação dos vírus foram realizadas segundo as técnicas recomendadas pela American Public Health Association²³.

Para as tentativas de isolamento de micoplasma foi utilizado o meio difásico²⁶.

Em cada meio para PPLO foram inoculados 0,2 ml do material da orofaringe

sem tratamento com antibióticos (o meio contém acetato de tálio e penicilina) e as garrafas foram incubadas a 37°C até o momento em que se observou a viragem do indicador da cor vermelha para amarela. Após uma passagem em caldo PPLO, o material foi inoculado em meio seletivo contendo azul de metileno para *Mycoplasma pneumoniae*²⁰, e também em meio sólido, para observação das colônias típicas do gênero *Mycoplasma*. A identificação sorológica definitiva do microrganismo isolado foi feita através das reações de inibição do crescimento²⁶, utilizando soro imune padrão anti-*M. pneumoniae*, gentilmente cedido pela Dra. M.S. Pereira, do Central Public Health Laboratory, Virus Reference Lab., Colindale, London.

Para as titulações dos anticorpos contra os vírus respiratórios foram empregadas as reações de inibição da hemaglutinação para os vírus da influenza e a fixação do complemento para adenovírus e vírus respiratório sincicial²¹.

O diagnóstico sorológico, nas duas amostras de soro do paciente, para anticorpos contra *M. pneumoniae*, foi realizado pela reação de inibição da fermentação, utilizando-se a amostra de *Mycoplasma pneumoniae* padrão (Mac Strain CIX3).

A determinação do título de crioaglutinina foi realizada no soro após retração do coágulo a 37°C, por 30 minutos, pela técnica usual²⁶.

RESULTADOS

Não foi isolado qualquer vírus nos meios de cultura utilizados para este fim. Nas amostras de soro do paciente, não houve elevação significativa do título de anticorpos para os vírus Influenza A/England/42/72, A/Hong Kong/1/68 e B/Massachusetts/66, adenovírus e vírus respiratório sincicial. Houve, no entanto, elevação ou aumento significativo do título de anticorpos para *Mycoplasma pneumoniae*, de mais de quatro vezes, como demonstra a tabela 1:

TAKIMOTO, S.; PANNUTI, C.S.; LEVI, G.C.; AMATO NETO, V.; BARBOSA, H.H.; TANAKA, H. & SALLES-GOMES, L.F. — Pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*: apresentação de um caso clínico com a respectiva comprovação etiológica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 109-117, 1974.

TABELA 1

Resultados das reações sorológicas

Antígeno	Soro	
	1.ª amostra Título	2.ª amostra Título
A/England/42/72*	20	10
A/Hong Kong/1/68*	20	20
B/Massachusetts/66*	10	10
Adenovírus**	16	8
Vírus respiratório sincicial**	8	8
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ***	8	128

* Inibição da hemaglutinação

** Fixação do complemento

*** Inibição metabólica

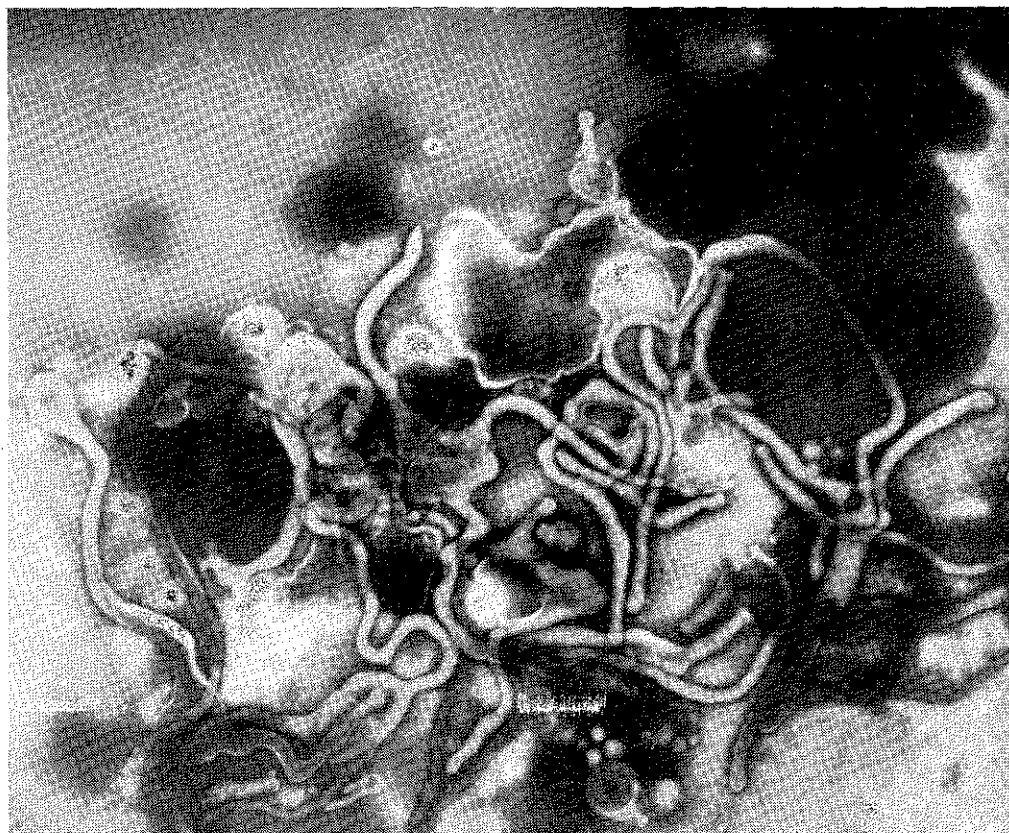


Fig. 2 — *Mycoplasma*: coloração negativa pelo ácido fosfotúngico. Aumento 9.600 X.

Após 20 dias de incubação, a 37°C, foi isolado, no meio de cultura para PPLO, um agente que demonstrou ao microscópio comum colônias típicas de micoplasma. Nos repiques, este agente multiplicou-se em meio contendo glicose e azul de metileno, que é considerado como meio seletivo para gênero e espécie *Mycoplasma pneumoniae*. O agente isolado foi completamente inibido no seu crescimento pelo anti-soro imune

padrão para *M. pneumoniae*, completando assim sua identificação. Foram também realizadas microfotografias eletrônicas do microrganismo isolado pelo método da coloração negativa (AFT), que revelou morfologia idêntica à do micoplasma (fig. 2). As evidências laboratoriais que resultaram do diagnóstico etiológico de certeza da infecção, neste paciente estudado, podem ser resumidas na tabela 2:

TABELA 2

Resultados dos exames feitos para *Mycoplasma pneumoniae* no soro e material orofaríngeo

Especificações	Amostras obtidas nos dias		
	20/08/73	30/08/73	06/09/73
Título das crioaglutininas	nf	256	1024
Título da reação de IF	8	nf	128
Isolamento do <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	nf	—

IF = inibição da fermentação

nf = não feito

+ = positivo

— = negativo

COMENTÁRIOS

A infecção por *M. pneumoniae* tem início geralmente insidioso, os sinais e sintomas aparecem após 2 a 4 dias do início da infecção. Os sintomas mais comuns são febre, que está presente em 94% dos casos, durando de 3 a 10 dias em média; tosse, que ataca 99% dos casos, sendo seca e paroxística no início. Mal-estar geral pode estar presente em cerca de 89% dos casos. Após 1 a 2 semanas de infecção, pode aparecer expectoração escassa que raramente é sanguinolenta^{2,3,4,17}. Além destas manifestações, podem ainda ocorrer cefaléia em 66% dos casos, dor de garganta em 54%, rouquidão em 37% e coriza em 29% dos casos de infecção por *M. pneumoniae*. Estes sintomas em conjunto poderiam levar à confusão diagnóstica com viroses do aparelho respiratório.

Ao exame físico é característico o bom estado geral do paciente, raramente se constata cianose, dispnéia ou outras manifestações de insuficiência respiratória, contrastando com o extenso comprometimento pulmonar visto por vezes ao exame radiológico do tórax⁸. É comum durante a propeidêutica pulmonar constatarem-se estertores sub-crepitantes, roncos e sibilos, sendo que estes últimos ocorrem principalmente na fase final da doença. Ao exame radiológico do tórax, a infecção não apresenta características próprias, mas demonstra, geralmente, uma imagem intersticial, unilateral em 80% dos casos, acometendo na maioria das vezes o lobo pulmonar, sendo por isto, muitas vezes, interpretado como imagem de broncopeumonia^{11, 13, 15}.

No caso em apreço, a febre durou 19 dias, a tosse manteve-se sempre seca, sem expectoração. Estes sinais, assim como a

imagem radiológica, regrediram rapidamente após a introdução da eritromicina, o que está de acordo com o encontrado na literatura especializada^{19,27,28}. É do conhecimento geral que muitas vezes a tetraciclina e a eritromicina, mesmo levando à melhora clínica, não conseguem erradicar totalmente o *M. pneumoniae* do organismo infectado, eis que o micoplasma continua sendo eliminado através das secreções respiratórias^{29,30}, constituindo-se o paciente em um portador da infecção. Em nosso caso, a eritromicina debelou a infecção e com muita possibilidade o *M. pneumoniae* foi erradicado, pois a tentativa de isolamento do agente, na convalescença, foi negativa. Deve-se ainda ressaltar que as penicilinas não têm ação sobre os micoplasmas porque este antibiótico age através da lesão da parede celular dos microrganismos e os micoplasmas são destituídos de parede celular.

Como foi demonstrada em numerosos trabalhos, a reação para determinar o título das crioaglutininas não é específica para *M. pneumoniae*, pois que 36% das reações positivas não são devidas a este agente e somente 50% dos casos de pneumonia primária atípica resultam positivos nesta reação^{16,18}. Por outro lado, a reação de inibição

da fermentação, usada neste trabalho, é das mais sensíveis e específicas para detectar anticorpos para *M. pneumoniae*, além de apresentar a vantagem de ser de fácil execução²⁶.

Nosso objetivo, ao apresentarmos este trabalho, foi demonstrar a existência de *M. pneumoniae* em nosso meio, como agente etiológico de grave doença respiratória, e que a identificação da infecção pode ser feita sorologicamente por uma reação específica e sensível, através da titulação de anticorpos em duas amostras de sangue colhidas na fase aguda e na convalescença da infecção. Concomitantemente, poderá ser tentado o isolamento e identificação do *M. pneumoniae* que, se resultar positivo, dará mais consistência ao diagnóstico de certeza da infecção em estado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a preciosa colaboração do Dr. M.O. Álvares Corrêa, do Instituto Adolfo Lutz; da Dra. M.S. Pereira, do Central Public Health Laboratory, e do Prof. Dr. E.A. Freundt, do WHO International Reference Center for Animal Mycoplasma.

RIAL-A/406

TAKIMOTO, S.; PANNUTI, C.S.; LEVI, G.C.; AMATO NETO, V.; BARBOSA, H.H.; TANAKA, H. & SALLES-GOMES, L.F. — *Mycoplasma pneumoniae* pneumonitis: a case report with etiological study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 109-117, 1974.

SUMMARY: *Mycoplasma pneumoniae* was isolated and identified from the throat of a 13 years old boy with X-rays appearance of bronchopneumonia involving the left lower lung. Serological tests showed a significant rise in antibody against *M. pneumoniae* in the convalescence serum. On the other hand, no significant rise was detected against Influenza virus A/England/42/72, A/Hong Kong/1/68, B/Massachusetts/66, adenoviruses and respiratory syncytial viruses.

The clinical features of the case and the response to the treatment with erythromycin were typical.

DESCRIPTORS: bronchopneumoniae; *Mycoplasma pneumoniae*.

TAKIMOTO, S.; PANNUTI, C.S.; LEVI, G.C.; AMATO NETO, V.; BARBOSA, H.H.; TANAKA, H. & SALLES-GOMES, L.F. — Pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*: apresentação de um caso clínico com a respectiva comprovação etiológica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 109-117, 1974.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, C.E.; HOPEWELL, P.; BURRELL, R.E. OLSON, N.O. & CHICK, E.W. — An epidemic of respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae* in a civilian population. *Am. Rev. resp. Dis.*, 95: 972-9, 1967.
2. ALEXANDER, E.R.; FOY, H.M.; KENNY, G.E.; KRONMAL, R.A.; McMAHAN, R., CLARKE, E.R.; MacCOLL, W.A. & GRAYSTON, J.T. — Pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*. Its incidence in the membership of a co-operative medical group. *New. Engl. J. Med.*, 275: 131-6, 1966.
3. BALASSANIAN, N. & ROBBINS, F.C. — *Mycoplasma pneumoniae* infection in families. *New Engl. J. Med.*, 277: 719-25, 1967.
4. BIBERFELD, G.; JOHNSON, T. & JOHNSON, J. — Studies on *Mycoplasma pneumoniae* infection in Sweden. *Acta path. microbiol. scand.*, 63: 469-75, 1965.
5. CHANOCK, R. M. — *Mycoplasma* infections of man. *New Engl. J. Med.*, 273: 1257-64, 1965.
6. CHANOCK, R.M.; HAYFLICK, L. & BARRILE, M.F. — Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. natn. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 48: 41-9, 1962.
7. CHANOCK R.M. *et alii* — *Mycoplasma pneumoniae*: proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). *Science (New York)*, 149: 662, 1963.
8. DECANQJ Jr., H.G. & LEE F.A. — *Mycoplasma pneumoniae*. Massive pulmonary involvement and pleural effusion. *J. am. med. Ass.*, 194: 1010-11, 1965.
9. EATON, M.D.; MEIKLEJOHN, G. & VAN HERICK, W. — Studies on the etiology of primary atypical pneumonia. A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos. *J. exp. Med.*, 79: 649-68, 1944.
10. EVANS, A.S.; ALLEN, V. & SUELTMANN, S. — *Mycoplasma pneumoniae* infection in University of Wisconsin students. *Am. Rev. resp. Dis.*, 96: 237-244, 1967.
11. FORSYTH, B.H.; BLOOM, H.H.; JOHNSON, K.M. & CHANOCK, R.M. — Etiology of primary atypical pneumonia in a military population. *J. Am. med. Ass.*, 191: 364-8, 1965.
12. FOY, H.M.; COONEY, M.K. McMAHAN, R. & GRAYSTON, J.T. — Viral and mycoplasmal pneumonia in a prepaid medical care group during an eight-year period. *Am. J. Epidem.*, 97: 93-102, 1973.
13. GEORGE, R.B.; WEILL, H.; RASH, J.R.; MOGABGAB, V. & ZISKIND, M.M. — Roentgenographic appearance of viral and mycoplasmal pneumoniae. *Am. Rev. resp. Dis.*, 96: 1144-50, 1967.
14. GLEEZEN, W.P.; THORNBURG, G.; CHIN, T.D.Y. & WENNER, H.A. — Significance of mycoplasma infections in children with respiratory disease. *Pediatrics (New York)*, 39: 516-25, 1967.
15. GRAYSTON, J.T.; ALEXANDER, E.R.; KENNY, G.E.; CLARKE, E.R.; FREEMONT, J.C. & MacCOLL, W.A. — *Mycoplasma pneumoniae* infections: clinical and epidemiologic studies. *J. am. med. Ass.*, 191: 369-374, 1965.
16. HAYFLICK, L. & CHANOCK, R.M. — *Mycoplasma* species of man. *Bacteriol. Rev.*, 29: 185-221, 1965.
17. HORNSLETH, A. — *Mycoplasma pneumoniae* infection in infants and children in Copenhagen — 1963-65. *Acta path. microbiol. scand.*, 69: 304-13, 1967.
18. JANSSON, E.; WAGER, O.; STENSTROM, R.; KLEMOLA, E. & FORSSELL, P. — Studies on Eaton PPLO pneumonia. *Brit. med. J.*, 1: 142-5, 1964.
19. KINGSTON, J.R.; CHANOCK, R.M.; MUFSON, M.A.; HELLMAN, L.P.; JAMES, W.D.; FOX, H.H.; MANKO, M.A. & BOYERS, J. — Eaton agent pneumonia. *J. am. med. Ass.*, 176: 118-23, 1961.
20. KRAYBILL, W.H. & CRAWFORD, Y.E. — A selective medium and color test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 118: 965-70, 1965.
21. LENNETTE, E.H., ed. — *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. 4th ed. New York, A.P.H.A., 1969.

TAKIMOTO, S.; PANNUTI, C.S.; LEVI, G.C.; AMATO NETO, V.; BARBOSA, H.H.; TANAKA, H. & SALLES-GOMES, L.F. — Pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*: apresentação de um caso clínico com a respectiva comprovação etiológica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 109-117, 1974.

22. LIU, C.; EATON, M.D. & HEYL, J.T. — Studies on primary atypical pneumonia. II. Observations concerning the development and immunological characteristics of antibody in patients. *J. exp. Med.*, 109: 545-56, 1959.
23. MOGABGAB, W.J. — *Mycoplasma pneumoniae* and adenovirus respiratory illnesses in military and university personnel, 1959-1966. *Am. Rev. resp. Dis.*, 97: 345-58, 1968. L
24. MUFSON, M.A.; MANKO, M.A.; KINGSTON, J.R. & CHANOCK, R.M. — Eaton agent pneumonia — clinical features. *J. am. med. Ass.*, 178: 369-74, 1961.
25. MUFSON, M.A.; CHANG, V.; GILL, V.; WOOD, S.C.; ROMANSKY, M.J. & CHANOCK, R.M. — The role of viruses, mycoplasmas and bacteria in acute pneumonia in civilian adults. *Am. J. Epidemiol.*, 86: 526-44, 1967.
26. PURCELL, R.H. & CHANOCK, R.M. — *Mycoplasma* of human origin. In: LENNETTE, E.; ed. *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. 4th ed. New York, A.P.H.A., 1969. p. 786-825.
27. RASCH, J.R. & MOGABGAB, W.I. — Therapeutic effect of erythromycin on *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5: 693-9, 1965.
28. SHAMES, J.M.; GEORGE, R.B.; HOLLIDAY, W.B.; RASCH, J.R. & MOGABGAB, W.J. — Comparison of antibiotics in the treatment of mycoplasmal pneumoniae. *Archs intern. Med.*, 125: 680-4, 1970.
29. SLOTKIN, R.I.; CLYDE, W.A. & DENNY, F.W. — The effect of antibiotics on *Mycoplasma pneumoniae* in vitro and in vivo. *Am. J. Epidemiol.*, 86: 225-37, 1967.
30. SMITH, C.; FRIEDWALD, W. & CHANOCK, R.M. — Shedding of *Mycoplasma pneumoniae* after tetracycline and erythromycin therapy. *New Engl. J. Med.*, 276: 1172, 1967.

Recebido para publicação em 19 de setembro de 1974.

ESPECIFICIDADE IMUNOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE DIFERENTES GRUPOS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* *

Solange Barros CARBONARE **
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Filomena B. M. JORDÃO **
Augusto de E. TAUNAY **

RIAL.A/407

CARBONARE, 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: 119-125, 1974.

RESUMO: A partir de culturas de *Neisseria meningitidis* em meio líquido e através de precipitação com Cetavlon (brometo de cetil trimetil amônio), foram obtidos polissacarídeos de oito diferentes grupos. A especificidade imunológica dos polissacarídeos foi estudada pelas reações de imunoeletroforese cruzada e hemaglutinação passiva contra soros de coelhos imunizados com *Neisseria meningitidis*, soro-grupos A, B, C, D, 29E, X, Y e Z.

DESCRITORES: *Neisseria meningitidis*; polissacarídeos de *Neisseria meningitidis*, especificidade imunológica.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem por objetivo estudar se o método de extração de polissacarídeo grupo específico de *Neisseria meningitidis*, preconizado por GOTSCHLICH *et alii*¹, poderia ser aplicado a outros grupos de *N. meningitidis* com a finalidade de utilizá-los nas reações de diagnóstico das infecções meningocócicas.

Para isso foram usados oito diferentes grupos de *N. meningitidis*, verificada a composição química dos antígenos extraídos pelo método acima citado, e analisada

a sua especificidade imunológica através de reações de eletroforese cruzada e hemaglutinação passiva.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Culturas de *Neisseria meningitidis*

N. meningitidis dos grupos A-962, B-2092, D-128 e Y, provenientes do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA, e C-642, 29 E-648, X-645 e Z-646, provenientes do Laboratoire de Recherches de Micro-

* Trabalho realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

biologie (Centre International de Référence pour les Méningocoques), Parc du Pharo, Marseille VII, France, foram empregadas.

Partindo de cultura em ágar-chocolate, foram semeados balões de 600 ml de meio Müller-Hinton líquido com 5% de soro de coelho. Após 18 horas de incubação em banho-maria, 36°C, com agitação, foi retirada uma amostra para verificar o número de germes por ml, em espectrofotômetro Coleman Jr. II a 650 nm e leitura contra curva padrão. O controle de pureza das culturas foi feito através de esfregaços em lâminas corados pelo método de Gram.

2. Extração do antígeno polissacarídeo

Usando a técnica de GOTSCHLICH *et alii*¹, nas culturas em meio líquido foi adicionado brometo de cetil trimetil amônio na proporção de 1 mg por 1 ml de meio. Deixou-se em repouso por uma hora e o precipitado formado foi lavado com solução salina 0,85%, tamponada com fosfato 0,01M com pH 7,2 (PBS 7,2), e posteriormente extraído exaustivamente com solução de cloreto de cálcio 0,9M e em seguida centrifugado.

Separados os sobrenadantes, precipitaram-se os ácidos nucléicos com etanol 25% em banho de gelo, que foram retirados por centrifugação e a seguir precipitou-se o polissacarídeo com etanol 80% e o precipitado final foi ressuspensionado em PBS-7,2.

3. Caracterização do antígeno

O trabalho foi baseado na caracterização do ácido siálico, principal componente do polissacarídeo da *N. meningitidis* do grupo C.

A identificação e quantificação do ácido siálico foi feita pelo método de SVENNERHOLD⁵, usando o reagente de resorcinol e o ácido siálico* como padrão.

A determinação de proteínas foi feita pelo método de LOWRY², utilizando-se rea-

gente de Folin e soro albumina bovina como padrão.

A determinação de lipídeos foi feita pelo método de ZOELLNER & KIRSCH⁶, utilizando-se o reagente de sufosfosvanilina e padrão de colesterol.

A detecção de carboidratos foi feita pelo método de SCOTT & MELVIN⁴, utilizando-se o reagente de antrona e glicose como padrão, que não permite a identificação de cada componente do carbo-hidrato.

4. Fracionamento do antígeno obtido de *N. meningitidis* do grupo C.

A fração solúvel obtida em PBS-7,2 foi passada em coluna de Sephadex G-200, cujo volume vazio era 9,0 ml e tampão de eluição PBS-7,2. Nos eluatos de 0,6 ml foi verificada a presença de ácido siálico e proteínas, sendo o primeiro através de reação com resorcinol e o segundo em espectrofotômetro Beckman D.U. em 280 nm.

5. Verificação da especificidade antigênica

Os soros imunes de coelhos foram obtidos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, que informou terem títulos aglutinantes, para o antígeno usado na sua produção, considerados satisfatórios.

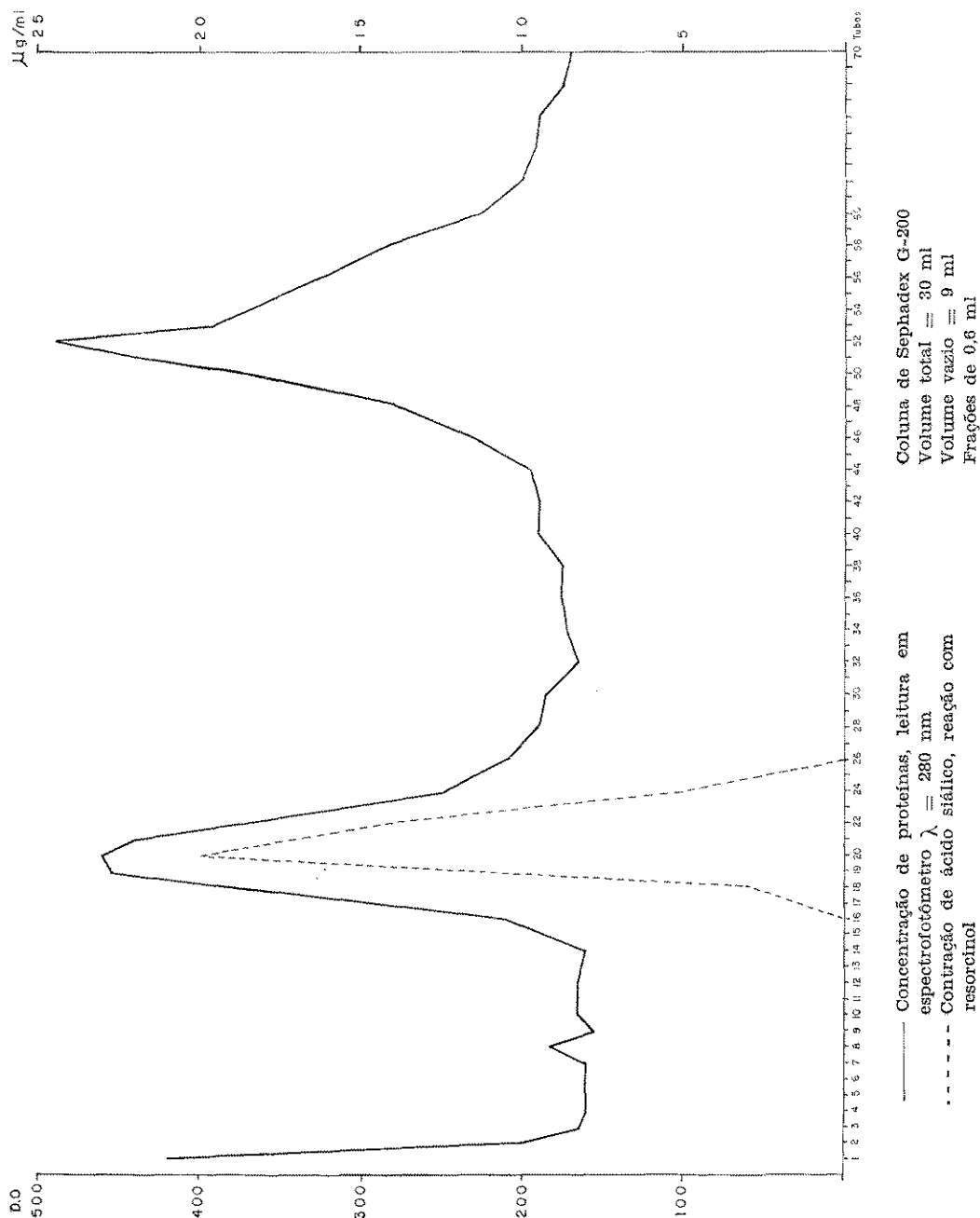
O antígeno correspondente a cada um dos grupos de *N. meningitidis* foi posto em presença dos vários soros imunes e feita separadamente a reação de imunoelectroforese cruzada³ (I.E.C.) e a de hemaglutinação passiva⁷ (H.P.). No caso do grupo C, foi também utilizada como padrão a vacina polissacarídeo C**.

RESULTADOS

A figura abaixo mostra o resultado da passagem do antígeno de *N. meningitidis*, grupo C, por coluna de Sephadex G-200, onde foram obtidos dois picos de proteínas e um pico de ácido siálico coincidente com o primeiro pico de proteína. Esta fração

* Sigma

** Merck Sharp & Dohme.



Análise do polissacarídeo de *Neisseria meningitidis*, Grupo C.

rica em ácido siálico encontra-se logo após o volume vazio da coluna, sugerindo um componente de peso molecular maior que 100.000 dáltons.

Na tabela 1 estão os vários componentes químicos dos diferentes antígenos. Avaliando-se a tabela, verifica-se que em todos os antígenos a fração polissaca-

TABELA 1

Características químicas dos polissacarídeos extraídos de *Neisseria meningitidis*.

Neisseria meningitidis Grupo	Polissacarídeos características químicas			
	Ácido siálico mg%	Proteínas mg%	Hexoses mg%	Lipídios
A	—	26 — 72	14 — 33	—
B	28	35 — 310	9 — 50	—
C	23,8 — 86	100 — 250	13,5 — 20,5	—
D	—	12,5 — 85	20 — 32,5	—
29 E	20,5	53,5 — 77	23 — 89	—
X	—	26,5 — 110	13 — 45	—
Y	6 — 13,2	23 — 32	26	—
Z	—	23 — 100	13 — 35	—

— = Negativo

rídica continha proteínas. Nos grupos B, C, 29 E e Y foi constatada a presença do ácido siálico como componente do polissacarídeo. Em nenhuma das preparações foi verificada a presença de lipídeos, aos níveis de sensibilidade da reação com sulfovanilina.

Os resultados da reação I.E.C. estão esquematizados na tabela 2. As reações sempre foram positivas quando se usou o anti-soro correspondente.

Reações cruzadas só ocorreram com os antígenos B e D frente aos anti-soros Z e C respectivamente.

Na tabela 3 estão esquematizadas as reações H.P. com hemácias sensibilizadas pelos vários antígenos frente aos anti-soros correspondentes, onde se verifica aparentemente não ter havido sensibilização das hemácias em presença dos antígenos D e Z; com os outros anti-soros as reações foram positivas, sem ocorrerem reações cruzadas.

DISCUSSÃO

Apesar de os volumes de cultura semeados terem sido sempre os mesmos, bem como o inóculo inicial, as variações de

crescimento foram bem grandes (de 6×10^8 a 3×10^9 bactérias/ml). Essa variação pode ter importância, pois determina maior ou menor rendimento nas extrações de antígeno.

As reações sorológicas efetuadas permitem evidenciar que os grupos B, C, 29 E e Y são entidades antigênicas distintas, apesar de apresentarem um componente comum — o ácido siálico. Com relação ao Grupo A, GOSCHLICH *et alii* já havia demonstrado que não possui ácido siálico, sendo o seu principal componente polissacarídeo a N-acetil monosamina fosfato.

As reações de hemaglutinação passiva mostram que os polissacarídeos obtidos foram capazes de sensibilizar hemácias frescas, com exceção dos de grupos D e Z. Esse fato pode ser devido a problemas de conformação molecular do complexo proteína-polissacarídeo, ou bloqueio de grupamentos do polissacarídeo importantes para a ligação com as hemácias, ou mesmo bloqueio ou ausências de receptores nas próprias hemácias, uma vez que os polissacarídeos D e Z contêm hexoses e proteínas em quantidades semelhantes às dos outros antígenos estudados.

TABELA 2

Reação de imunoeletroforese cruzada entre polissacarídeos extraídos de vários grupos de N. meningitidis e anti-soros de coelho específicos para cada grupo.

Anti-soro / Antígeno	A	B	C	D	29 E	X	Y	Z
A	+	-	-	-	-	-	-	-
B	-	+	-	-	-	-	-	+
C	-	-	+	-	-	-	-	-
D	-	-	+	+	-	-	-	-
29 E	-	-	-	-	+	-	-	-
X	-	-	-	-	-	+	-	-
Y	-	-	-	-	-	-	+	-
Z	-	-	-	-	-	-	-	+

- = Negativo

+ = Positivo

TABELA 3

Titulos obtidos na reação de hemaglutinação passiva entre polissacarídeos extraídos dos vários grupos de Neisseria meningitidis e anti-soros de coelho específicos para cada grupo.

Anti-soro / Antígeno	A	B	C	D	29 E	X	Y	Z
A	32.000	-	-	-	-	-	-	-
B	-	64	-	-	-	-	-	-
C	-	-	512	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-
29 E	-	-	-	-	128	-	-	-
X	-	-	-	-	-	32	-	-
Y	-	-	-	-	-	-	8.000	-
Z	-	-	-	-	-	-	-	-

-- = Negativo

Diluições iniciais

Anti-soro A = 1:32

Outros anti-soros = 1:16

Na tabela 3 pode-se verificar que a reação H.P. é altamente específica para detecção de anticorpos no soro, não havendo reações cruzadas entre os diferentes grupos.

As reações de I.E.C. também foram específicas para cada grupo, apenas os antígenos B e D reagiram positivamente com os anti-soros Z e C, respectivamente; no entanto, as reações inversas não ocorreram, ou seja, antígeno Z e C com anti-soros B e D não reagiram. Este aparente paradoxo pode ser explicado levando-se em conta que todas as preparações polissacarídicas estavam contaminadas com uma fração protéica, sendo que, no fracionamento em coluna do antígeno C, parte desta proteína revelou-se associada ao polissacarídeo. Como já ficou revelado largamente na literatura, a porção polissacarídica das *Neisseria* é grupo-específica, o mesmo não ocorrendo com a fração protéica, pois existem algumas frações protéicas comuns a vários grupos destas bactérias.

Provavelmente os polissacarídeos B e D estão contaminados com proteínas comuns a Z e C respectivamente. Como os anti-soros de coelho são preparados contra a bactéria total e não apenas contra a fração polissacarídica, provavelmente as reações cruzadas são devidas a proteínas e não ao polissacarídeo.

Essa fração protéica eventualmente poderia ser eliminada através de uma hidrólise enzimática proteolítica.

CONCLUSÃO

Diante desses resultados, pode-se concluir que os antígenos polissacarídeos extraídos pelo método empregado neste trabalho, quando sensibilizam hemácias, podem ser usados para fins diagnósticos, uma vez que são grupo-específicos para as *Neisseria*.

RIAL-A/407

CARBONARE, S. B.; TAKEDA, A. K.; JORDÃO, F. B. M. & TAUNAY, A. E. Immunological specificity of polysaccharides obtained from different groups of *Neisseria meningitidis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 119-125, 1974.

SUMMARY: Polysaccharides obtained from eight *Neisseria meningitidis* serogroups were studied with respect to their immunological specificity. Antigen was obtained from liquid medium cultures by means of precipitation made with Cetavlon (cetyl-trimethyl ammonium bromide).

The immunological specificity of such polysaccharides was studied by means of counterimmunoelectrophoresis and haemagglutination assays. The sera employed in this assays was obtained from rabbits immunized with *Neisseria meningitidis* of A, B, C, D, 29E, X, Y and Z groups. No cross-reactions were observed among any of the polysaccharides here obtained.

DESCRIPTORS: *Neisseria meningitidis*; polysaccharides from *Neisseria meningitidis*, immunological specificity.

CARBONARE, 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**: 119-125, 1974.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y. & ARTENSTEIN, M. S. — Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A. *J. exp. Med.*, **129**: 1349-65, 1969.
2. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**: 265-75, 1951.
3. PALHARES, M.; GELLI, S. 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 cefalorraquidiano por imunoelctroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **33**: 85-9, 1973.
4. SCOTT, T. A. & MELVIN, E. H. — Determination of dextran with anthrone. *Analyt. Chem.*, **25**: 1656-61, 1953.
5. SVENNERHOLD, L. — Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochem. biophys. Acta*, **24**: 604-611, 1957.
6. ZOELLNER, N. & KIRSCH, K. — Uber die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen beanten Plasmalipoden) gemeinsamen sulfophosphovanillin Reaktion. *Z. ges. exp. Med.*, **135**: 545, 1962.
7. TAKEDA, A. K.; TAUNAY, A. E.; SCALABRINI, L. G. P. & CASTRO, I. O. — Anticorpos antipolissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*: detecção através da hemaglutinação passiva em soros de pacientes e de vacinados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 127-133, 1974.

Recebido para publicação em 7 de outubro de 1974.

ANTICORPOS ANTIPOLISSACARÍDEO C DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*: DETECÇÃO ATRAVÉS DA HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA EM SOROS DE PACIENTES E DE VACINADOS *

Augusta Kiyomi TAKEDA**
Augusto de E. TAUNAY**
Luiz G. P. SCALABRINI**
Ivan de Oliveira de CASTRO***

RIAL-A/408

TAKEDA, A. K.; TAUNAY, A. E.; SCALABRINI, L. G. P. & CASTRO, I. O.
— Anticorpos anti-polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*: detecção através da hemaglutinação passiva em soros de pacientes e de vacinados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 127-133, 1974.

RESUMO: Foi utilizada a reação de hemaglutinação passiva para avaliar a resposta humoral antipolissacarídica C em dois grupos populacionais, na região da Grande São Paulo, S.P. e em um grupo em Ipatinga, M.G., Brasil, após a vacinação com a vacina anti-meningocócica, grupo C. A mesma técnica também foi usada para pesquisa de anticorpos da mesma natureza em pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de meningite meningocócica, a fim de avaliar sua especificidade como método diagnóstico. Os resultados obtidos autorizam o emprego dessa técnica como método seguro e específico.

DESCRITORES: *Neisseria meningitidis*, grupo C; hemaglutinação passiva, no diagnóstico da meningite meningocócica; meningite, meningocócica.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de anticorpo antipolissacarídeo pela reação de hemaglutinação passiva com hemácias sensibilizadas foi introduzida por SANBORN & VEDROS⁵.

Apesar de a sensibilidade dessa reação ser menor do que a do ensaio radioimune, sua especificidade nunca foi contestada.

Sendo uma técnica de fácil execução,

foi estudada a sua aplicabilidade, na avaliação da vacina anti-meningocócica do grupo C, a dois grupos populacionais da região da Grande São Paulo, S.P. e a um grupo em Ipatinga, M.G. Também foi pesquisado o desenvolvimento de anticorpos da mesma natureza em pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de meningite meningocócica, a fim de avaliar sua especificidade como método diagnóstico.

* Trabalho realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Hospital Emilio Ribas, São Paulo, S. P.

MATERIAL E MÉTODOS

Vacina utilizada

Polissacarídeo de *Neisseria meningitidis*, grupo C*.

Amostras

Foram estudados soros de quatro grupos populacionais:

Grupo 1 - 98 crianças normais, de 6 meses a 3 anos de idade, vacinadas com 50 µg. Foram colhidas 2 amostras: uma, antes, e outra 30 dias após a vacinação.

Grupo 2 - 77 jovens entre 13 a 17 anos de idade, do sexo masculino, de uma Instituição escolar parcialmente fechada, vacinados com 100 µg. Foram colhidas 3 amostras: uma, antes da vacinação, duas outras, após 30 e 90 dias da vacinação.

Grupo 3 - 150 indivíduos normais de 1 a 20 anos de idade, vacinados com 50 µg. Foram colhidas 3 amostras: uma, antes da vacinação, e duas outras, a 14 e 30 dias a partir da data da vacinação.

Grupo 4 - 279 crianças de 6 meses a 3 anos de idade, internadas no Hospital Emílio Ribas, São Paulo, S. P., com meningite meningocócica. Foram colhidas 3 amostras: a primeira, na internação; a segunda, por ocasião da alta e a terceira, trinta dias após a alta.

Antígenos

Foram empregados na ocasião dois antígenos:

1.º — A vacina polissacarídeo do grupo C*.

2.º — Polissacarídeo do grupo C extraído de *Neisseria meningitidis*** do grupo C.

Sensibilização das hemácias

Lavar 6 ml de suspensão a 10% de hemácias humanas "O", Rh negativo, três vezes em solução salina tamponada (NaCl-0,15 M; fosfatos — 0,01 M), pH 7,2, centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos. Dividir o sedimento em dois lotes. Ao primeiro, adicionar 2 ml de antígeno, ao segundo, adicionar 2 ml de solução salina tamponada (NaCl-0,15 M, fosfatos-0,01 M), pH 6,9, para controle da reação. Inocular em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos.

Lavar as duas suspensões em solução salina tamponada pH 6,9. Ressuspender o sedimento a 4 ml da mesma solução salina à qual se adicionou 0,5% de soroalbumina bovina.

Determinação da concentração ótima sensibilizante do antígeno

Determinada por meio de titulação em bloco, variando-se as concentrações dos antígenos que foram estabelecidos por dosagem química, pelo método de Svennerholm⁶ para ácido siálico. Para 0,024 ml de papa de hemácias, a concentração do polissacarídeo utilizado variou de 1 — 3 µg/ml para o antígeno por nós preparado e de 3,5 — 7 µg/ml quando foi utilizada a vacina.

Técnica da reação

Em placas de hemaglutinação*: adicionar 50 µl de solução salina tamponada (NaCl - 0,15 M, fosfatos - 0,01 M), pH 6,9, adicionada de 0,5% de soroalbumina bovina,

* Meningococcus group C vaccine, Merck Sharp & Dohme Research Labs., New Jersey and West Point, Pa., E. U. A.

** Amostra C-1054, proveniente do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, E. U. A.

* Microtiter, Cook Engineering Company, E. U. A.

a todos os orifícios. Em seguida, adicionar 50 μ l de cada novo soro em duplicata e, com alças diluidoras, proceder a diluições sucessivas, de razão 2, de todos os soros.

Distribuir na primeira linha correspondente a cada soro 50 μ l de hemácias

sensibilizadas e, na segunda linha, 50 μ l de hemácias não sensibilizadas, como controle.

Incubar as placas em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 3 horas. Leitura, para verificação ou não de aglutinação, como demonstrado na fig. 1:

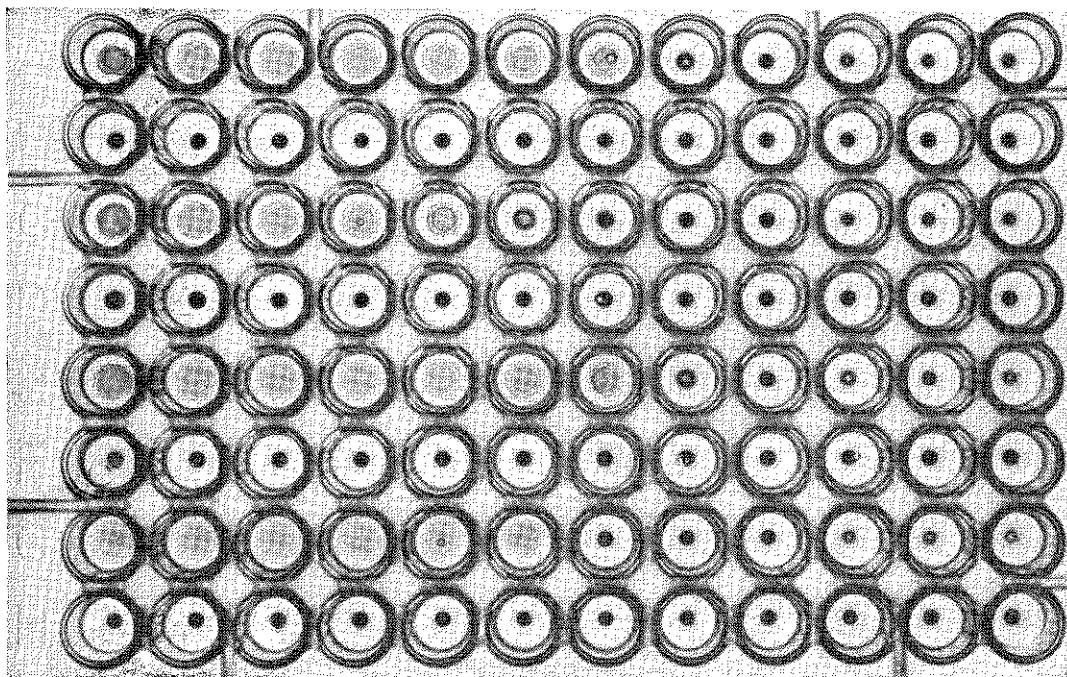


Fig. 1 — Placa demonstrativa da reação de hemaglutinação passiva.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

A figura 2 mostra a variação de títulos em crianças vacinadas pertencentes ao primeiro grupo. Neste grupo praticamente não houve conversão de títulos.

No grupo de 13 a 17 anos (fig. 3), após 30 dias da vacinação, verificou-se conversão sorológica em 95% dos indivíduos. Já, na amostra colhida 90 dias após a vacinação, em 27% não foi possível mostrar a presença de anticorpos no sangue, mostrando

serem estes anticorpos de natureza fugaz. Estes resultados permitem concluir que, na dose empregada para essa população, a vacina mostrou-se capaz de induzir à formação de anticorpos.

O terceiro grupo, cuja idade variou de 1 a 20 anos, como mostra a tabela 1, confirma os dados anteriores, ou seja, na faixa etária de 1 a 3 anos, 4,35% converteram o título, enquanto que, na faixa de 20 anos, 88,9% converteram o título.

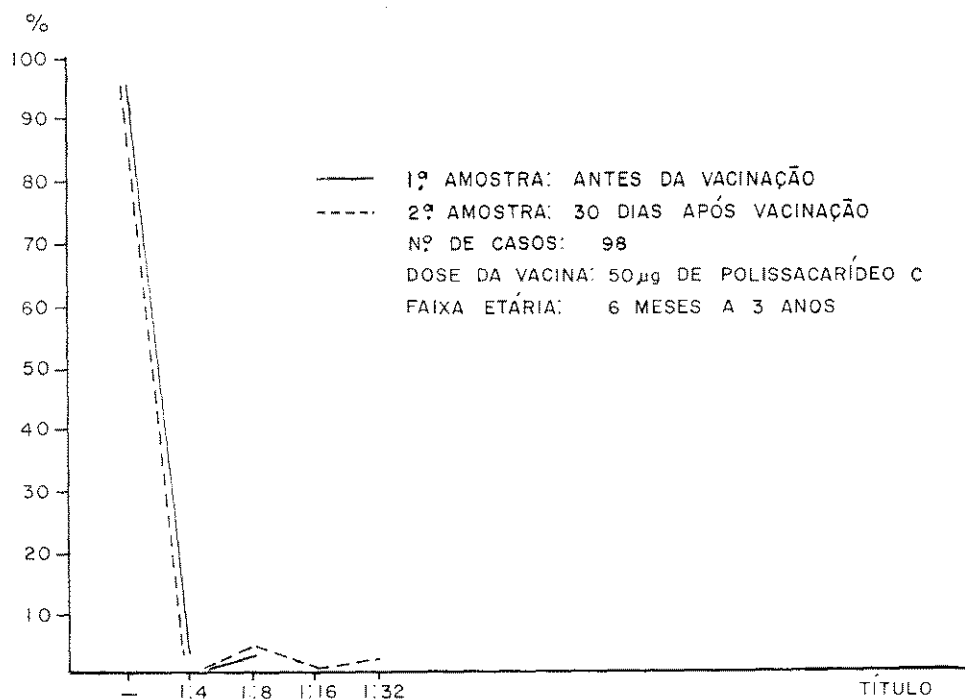


Fig. 2 — Detecção de anticorpos contra polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*, através da reação de hemaglutinação passiva. Grupo 1.

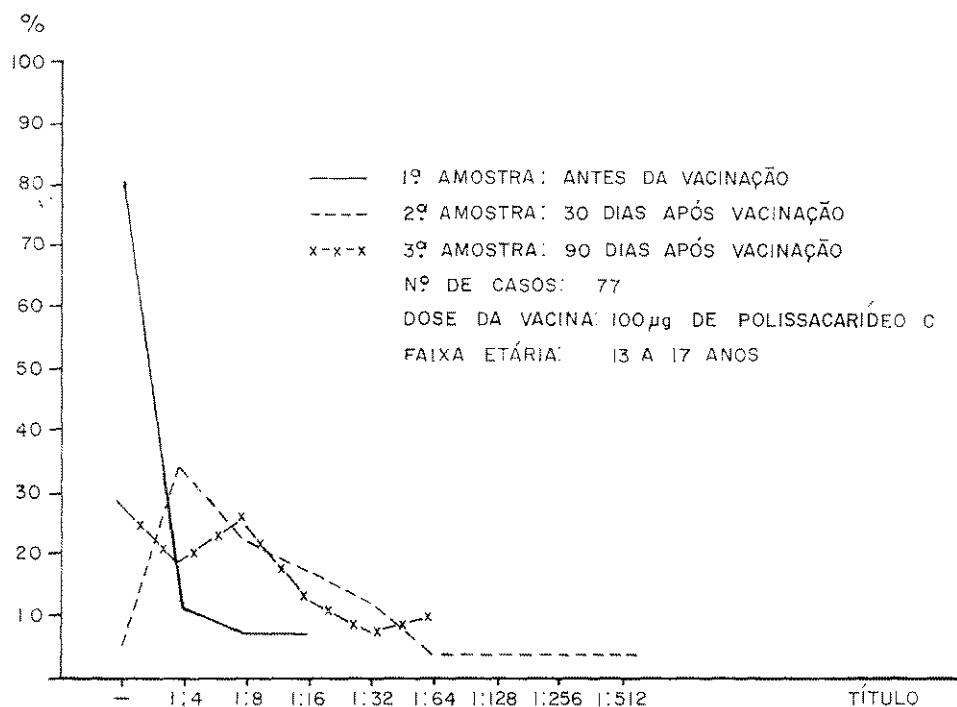


Fig. 3 — Detecção de anticorpos contra polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*, através da reação de hemaglutinação passiva. Grupo 2.

TABELA 1 -

Avaliação da resposta à vacina polissacarídica C em diferentes faixas etárias, em Ipatinga, M. G.

Títulos	Faixa etária (anos)					
	1 — 3	4 — 5	6 — 10	11 — 15	16 — 19	20
S/conversão	22 (95,65%)	15 (78,95%)	23 (74,20%)	10 (43,48%)	7 (31,82%)	2 (11,10%)
C/conversão	1 (4,35%)	4 (21,05%)	8 (25,80%)	13 (56,52%)	15 (68,18%)	16 (88,90%)
Total	23	19	31	23	22	18

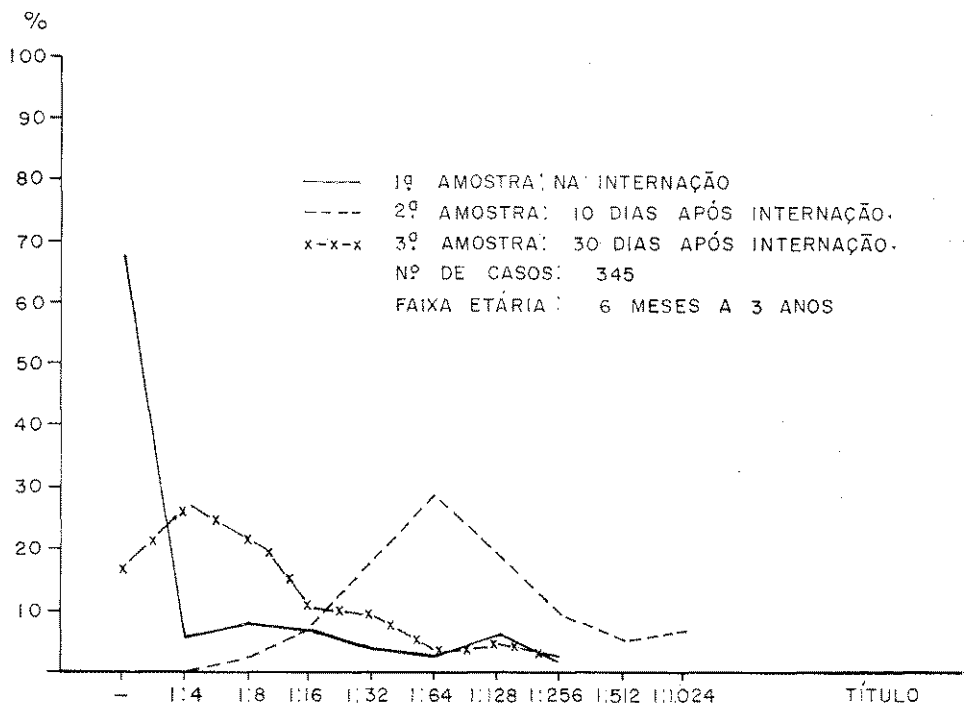


Fig. 4 — Detecção de anticorpos contra polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*, através da reação de hemaglutinação passiva. Grupo 3.

No quarto grupo (fig. 4) procurou-se verificar se nas meningites de provável etiologia bacteriana e especificamente meningocócica apareciam anticorpos contra o polissacarídeo C, uma vez que no grupo vacinado da mesma faixa etária a conversão de título variou em proporções muito

baixas (fig. 2). Por esta figura podemos verificar que houve 100% de conversão de títulos após 10 dias da internação e que, após 30 dias, 18% desses indivíduos se tornaram negativos, o que vem a confirmar a natureza fugaz destes anticorpos.

TABELA 2

Especificidade da reação de hemaglutinação passiva para Neisseria meningitidis, grupo C.

N.º de Casos	Bacterioscopia	Cultura	IEC	Conversão de títulos no soro %
194	+	+	+	100
151	-	-	-	36,5
21*	-	-	-	0

IEC = imunoelectroforese cruzada

+ = positivo

- = negativo

* = positivo para outra etiologia que não a meningocócica.

Por esta tabela, sempre que o exame bacterioscópico, a cultura e a pesquisa do polissacarídeo no líquor foram positivos, a conversão de títulos na reação de hemaglutinação também o foi. Quando a bacterioscopia, a cultura e a pesquisa de polissacarídeo no líquor foram negativas, houve 36,5% de conversão de títulos. Com relação a infecções meníngeas de outra etiologia, não houve desenvolvimento de anticorpos específicos ou, se presentes, não houve conversão de títulos nas reações subsequentes.

O fato de se obterem 36,5% de resultados positivos com conversão sorológica, sendo os demais exames negativos, leva a acreditar ser este método mais sensível que os outros empregados, uma vez que em todos os casos a sintomatologia clínica e o exame químico-citológico do líquor indicavam tratar-se de infecção bacteriana das meninges que, no caso presente, foi inti-

tulada como sendo infecção meningocócica do grupo C.

Diante desses resultados, conclui-se que a vacina induz à formação de anticorpos específicos, de preferência nos grupos etários acima de 3 anos. A ausência da resposta para grupos etários abaixo de 3 anos poderia ser justificada pela incapacidade de resposta frente ao antígeno polissacarídico, por ter-se usado uma dose insuficiente, ou pela falta de contacto anterior desta população com o agente infeccioso.

A reação de hemaglutinação com hemáceas sensibilizadas com polissacarídeo extraído da *N. meningitidis* do grupo C, mostrou-se excelente como método de diagnóstico de grande auxílio no esclarecimento de casos em que falharam os métodos usuais de diagnóstico da doença meningocócica.

RIAL-A/408

TAKEDA, A. K.; TAUNAY, A. E.; SCALABRINI, L. G. P. & CASTRO, I. O. — Antibodies against polysaccharide C of *Neisseria meningitidis*: detection through passive haemagglutination in sera from patients and vaccinated normal persons. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 127-133, 1974.

SUMMARY: Passive haemagglutinating reaction was used to evaluate the humoral immune response against polysaccharide C of two population groups, one of the São Paulo metropolitan area and another of Ipatinga, M. G., both in Brazil, after vaccination with anti-group C meningococcal vaccine. Same techic was used to detect the same type of antibodies in patients wich clinical and laboratory diagnosis of meningococcal meningitis, in order to evaluate its specificity as a diagnosis method. The results confirmed the specificity of this reaction.

DESCRIPTORS: *Neisseria meningitidis*, serogroup C; passive haemagglutination in meningococcal meningitis, diagnostic method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COHEN, R. L. & ARTENSTEIN, M. S. — Hemagglutination inhibition for serogroups of *Neisseria meningitidis*. *Appl. Microbiol.*, 23: 289-92, 1972.
2. EDWARDS, E. A. & DRISCOLL, W. S. — Group specific hemagglutination test for *Neisseria meningitidis* antibodies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 126: 876-79, 1967.
3. HAMMOND, B. W.; KINGSBURY, D. T. & WEISS, E. — Modification of meningococcal polysaccharide antigens for use in passive hemagglutination tests. *J. Immun.*, 101: 808-9, 1968.
4. HUNTLEY, B. & REED, D. — An indirect hemagglutination test for group B meningococcus. *Am. J. Epidem.*, 86: 142-8, 1967.
5. SANBORN, W. R. & VEDROS, N. A. — Possibilities of application of complement fixation, indirect hemagglutination and fluorescent antibody test to epidemiology of meningococcal infection. *Hi th Lab. Sci.*, 3: 111-7, 1966.
6. SVENNERHOLM, L. — Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol — hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta*, 24: 604-11, 1957.

Recebido para publicação em 7 de outubro de 1974.

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

- AMATO NETO, V. RIAL-A/406, 34: 109
BARBOSA, H. H. RIAL-A/406, 34: 109
CARBONARE, S. B. RIAL-A/407, 34: 119
CASTRO, I. O. RIAL-A/408, 34: 127
CHAVES, M. A. RIAL-A/395, 34: 23
COLNAGO, E. J. RIAL-A/400, 34: 53
DECÂNIO, M. V. RIAL-A/394, 34: 18
GARRIDO, N. S. RIAL-A/399, 34: 47
RIAL-A/404, 34: 95
RIAL-A/404, 34: 95
HOFER, E. RIAL-A/400, 34: 53
JORDÃO, F. B. M. RIAL-A/407, 34: 119
LACERDA, M. D. RIAL-A/400, 34: 53
LARA, W. H. RIAL-A/397, 34: 35
RIAL-A/402, 34: 79
LEVI, G. C. RIAL-A/406, 34: 109
LOPEZ, F. C. RIAL-A/396, 34: 29
MALACHOWSKA, M. I. RIAL-A/393, 34: 9
MELLES, C. E. A. RIAL-A/400, 34: 53
RIAL-A/405, 34: 101
MORAIS, J. S. RIAL-A/400, 34: 53
PANNUTI, C. S. RIAL-A/406, 34: 109
PESSÓA, G. V. A. RIAL-A/400, 34: 53
RIAL-A/405, 34: 101
PESSÓA, S. B. RIAL-A/403, 34: 82
PISSATTO, N. L. RIAL-A/401, 34: 69
PREGNOLATTO, W. RIAL-A/398, 34: 41
RIAL-A/399, 34: 47
RIAL-A/401, 34: 69
RIAL-A/404, 34: 95
RASKIN, M. RIAL-A/405, 34: 101
ROTH, A. RIAL-A/393, 34: 9
SABINO, M. RIAL-A/398, 34: 41
SALLES-GOMES, L. F. RIAL-A/406, 34: 109
SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz RIAL-A/392, 34: 1
SCALABRINI, L. G. P. RIAL-A/408, 34: 127
SCARPELLI, M. F. RIAL-A/395, 34: 23
TAKAHASHI, M. Y. RIAL-A/397, 34: 35
TAKEDA, A. K. RIAL-A/407, 34: 119
RIAL-A/408, 34: 127
TAKEUCHI, C. RIAL-A/405, 34: 101
TAKIMOTO, S. RIAL-A/406, 34: 109
TANAKA, H. RIAL-A/406, 34: 109
TAUNAY, A. E. RIAL-A/407, 34: 119
RIAL-A/408, 34: 127
TOLEDO, M. RIAL-A/404, 34: 95
VILHENA, M. I. RIAL-A/400, 34: 53
YABIKU, H. Y. RIAL-A/402, 34: 79

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Ácido acetil-salicílico
em solução de L-lisina base RIAL-A/395,
34: 23
- Akodon (Thaptomys) nigrita* RIAL-A/403,
34: 82
- Bacteriófagos RIAL-A/400, 34: 53
- Broncopneumonia RIAL-A/406, 34: 109
- Café (torrado e moído)
determinação do sedimento e cascas
RIAL-A/396, 34: 29
- Clyomys* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Cromatografia em camada delgada
eritromicina, determinação
em medicamentos RIAL-A/399, 34: 47
sorbitol, identificação RIAL-A/402, 34: 79
sulfato de neomicina, determinação
em medicamentos RIAL-A/398, 34: 41
- Dicloridrato de buclizina
características
determinação em medicamentos
espectrofotometria
titulação em meio não aquoso
RIAL-A/401, 34: 69
- Entamoeba histolytica* RIAL-A/403, 34: 82
- Eperythrozoon* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Eritromicina
determinação em medicamentos
cromatografia em camada delgada
espectrofotometria RIAL-A/399, 34: 47
- Espectrofotometria
Ácido acetil-salicílico
em solução de L-lisina base, estabilidade
RIAL-A/395, 34: 23
- Febre tifóide (São Paulo, Br.)
RIAL-A/400, 34: 53
- Fruta
características histológicas
identificação microscópica
em néctares
em sucos RIAL-A/394, 34: 18
- Fungos
em néctares de fruta
em sucos de fruta RIAL-A/394, 34: 18
- Haemobartonella muris* RIAL-A/403, 34: 82
- Hepatozoon* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- José Pedro de Carvalho Lima, necrológico
RIAL-A/392, 34: 1
- Laranja de acridina
ação sobre o vírus RIAL-A/393, 34: 9
- Líquido cefalorraquidiano RIAL-A/405,
34: 101
- Listeria monocytogenes*
isolamento no líquido cefalorraquidiano
RIAL-A/405, 34: 101
- Medicamentos
dicloridrato de buclizina RIAL-A/401,
34: 69
- Meningite por *Listeria* RIAL-A/405, 34: 101
- Meningite meningocócica
método diagnóstico
hemaglutinação passiva RIAL-A/408,
34: 127
- Mercurio, resíduos
determinação em peixe (Brasil)
espectrofotometria RIAL-A/404, 34: 95

- Mycoplasma pneumoniae* RIAL-A/406,
34: 109
- Necrológico
José Pedro de Carvalho Lima
RIAL-A/392, 34: 1
- Néctares de fruta RIAL-A/394, 34: 18
- Nectomys* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Nectomys squamipes* RIAL-A/403, 34: 82
- Neisseria meningitidis* RIAL-A/407, 34: 119
- Neisseria meningitidis*, grupo C
detecção de anticorpos
hemaglutinação passiva RIAL-A/408,
34: 127
- Neomicina, sulfato
determinação em medicamentos
cromatografia em camada delgada
espectrofotometria RIAL-A/398, 34: 41
- Nitrato
determinação em sais de cura
espectrofotometria RIAL-A/397, 34: 35
- Nitrito
determinação em sais de cura
espectrofotometria RIAL-A/397, 34: 35
- Oryzomys* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Parasitas
em ratos silvestres (São Paulo, Br.)
RIAL-A/403, 34: 82
- Peixe (Brasil)
mercúrio residual, determinação
espectrofotometria RIAL-A/404, 34: 95
- Polissacarídeos bacterianos
Neisseria meningitidis
especificidade imunológica
RIAL-A/407, 34: 119
- Porocephalus crotali* RIAL-A/403, 34, 82
- Proechmys iheringi* RIAL-A/403, 34: 82
- Ratos silvestres (São Paulo, Br.)
RIAL-A/403, 34: 82
- Sais de cura
nitrato, nitrito, determinação
RIAL-A/397, 34: 35
- Salmonella typhi* RIAL-A/400, 34: 53
- Sorbitol
identificação
cromatografia em camada delgada
RIAL-A/402, 34: 79
- Sucos de fruta RIAL-A/394, 34: 18
- Trypanosoma renjifo* Deane, 1961
RIAL-A/403, 34: 82
- Vírus
herpético
vacínico RIAL-A/393, 34: 9

SUBJECT INDEX

- Acetylsalicylic acid
in L-lysine base solution RIAL-A/395,
34: 23
- Acridine orange
effect on the virus RIAL-A/393, 34: 9
- Akodon (Thaptomys) nigrita*
RIAL-A/403, 34: 82
- Bacteriophage RIAL-A/400, 34: 53
- Brines
curing brines
nitrate, nitrite determination
RIAL-A/397, 34: 35
- Bronchopneumonia RIAL-A/406, 34: 109
- Buclizine dihydrochloride
characteristics
determination, in pharmaceuticals
spectrophotometry
titration in a non-aqueous medium
RIAL-A/401, 34: 69
- Cerebrospinal fluid RIAL-A/405, 34: 101
- Chromatography, thin-layer
erythromycin, determination
in pharmaceuticals RIAL-A/399, 34: 47
neomycin sulfate, determination
in pharmaceuticals RIAL-A/398, 34: 41
sorbitol, identification RIAL-A/402,
34: 79
- Clyomys* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Coffee (ground and roasted)
detection of sediment and peels
RIAL-A/396, 34: 29
- Entamoeba histolytica* RIAL-A/403, 34: 82
- Eperythrozoon* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Erythromycin
determination of, in pharmaceuticals
spectrophotometry
thin-layer chromatography
RIAL-A/399, 34: 47
- Fish (Brazil)
mercury residues, determination
spectrophotometry RIAL-A/404, 34: 95
- Fruit
characteristics, histological
identification, microscopical
in fruit juices RIAL-A/394, 34: 18
- Fruit juices RIAL-A/394, 34: 18
- Fungi
in fruit juices RIAL-A/394, 34: 18
- Haemobartonella muris* RIAL-A/403,
34: 82
- Hepatozoon* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- José Pedro de Carvalho Lima, necrology
RIAL-A/392, 34: 1
- Listeria monocytogenes*
isolation, in cerebrospinal fluid
RIAL-A/405, 34: 101
- Meningitis, *Listeria* RIAL-A/405, 34: 101
- Meningitis, meningococcic
diagnostic method
passive haemagglutination
RIAL-A/408, 34: 127

- Mercury, residues
determination in fish (Brazil)
spectrophotometry RIAL-A/404: 34: 95
- Mycoplasma pneumoniae* RIAL-A/406,
34: 109
- Necrology
José Pedro de Carvalho Lima
RIAL-A/392, 34: 1
- Nectomys* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Nectomys squamipes* RIAL-A/403, 34: 82
- Neisseria meningitidis* RIAL-A/407, 34: 119
- Neisseria meningitidis*, serogroup C
antibodies, detection
passive haemagglutination
RIAL-A/408, 34: 127
- Neomycin, sulfate
determination of, in pharmaceuticals
spectrophotometry
thin-layer chromatography
RIAL-A/398, 34: 41
- Nitrate
determination of, in curing brines
spectrophotometry RIAL-A/397, 34: 35
- Nitrite
determination of, in curing brines
spectrophotometry RIAL-A/397, 34: 35
- Oryzomys* sp. RIAL-A/403, 34: 82
- Parasites
in rats, wild RIAL-A/403, 34: 82
- Pharmaceuticals
buclizine dihydrochloride RIAL-A/401,
34: 69
- Polysaccharides, bacterial
Neisseria meningitidis
specificity, immunological
RIAL-A/407, 34: 119
- Porocephalus crotali* RIAL-A/403, 34: 82
- Proechmys iheringi* RIAL-A/403, 34: 82
- Rats, wild (São Paulo, Br.) RIAL-A/403,
34: 82
- Salmonella typhi* RIAL-A/400, 34: 53
- Sorbitol
identification
thin-layer chromatography
RIAL-A/402, 34: 79
- Spectrophotometry
acetylsalicylic acid
in L-lysine base solution, stability
RIAL-A/395, 34: 23
- Trypanosoma renjifo* Deane, 1961
RIAL-A/403, 34: 82
- Typhoid (São Paulo, Br.) RIAL-A/400,
34: 53
- Virus
herpetic
vaccinic RIAL-A/393, 34: 9